

明 細 書

哺乳類型糖鎖生産メチロトロフ酵母

技術分野

本発明は、メチロトロフ酵母を用いてアスパラギン残基に哺乳類細胞の生産する糖鎖と同一の糖鎖構造を有する抗原性のない哺乳類型糖蛋白質を大量に製造する方法を提供する。より詳細には、本発明は、メチロトロフ酵母の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株に強力なプロモーターの支配下にて α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を小胞体（ER）に導入・高発現させることによって作成された、哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質生産能を持つ新規な酵母変異株、及び該変異株に異種遺伝子を導入したメチロトロフ酵母細胞を培地に培養し、その培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を得ることを特徴とする、哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質の製造方法に関する。

背景技術

酵母は外来蛋白質の生産宿主としても形質転換系の確立に伴い、盛んに検討されてきた。酵母を外来蛋白質生産の場として利用する利点としては、分子遺伝学的操作並びに培養が、原核生物なみに容易である上に、糖鎖付加を始めとした翻訳後の蛋白質修飾を行う真核生物型の機能を有していることが挙げられる。しかしながら、Saccharomyces cerevisiaeを用いた蛋白質生産は一部の例外的な成功例を除いて生産量が低く、Saccharomyces cerevisiae以外の酵母を用いた外来蛋白質生産の系が開発されてきた。例えば Shizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、メチロトロフ酵母等の系などである。

メチロトロフ酵母（メタノール資化性酵母；methylophilic yeast；methanol-utilizing yeast）は、メタノールを単一の炭素源として生育することができる酵母で、外来蛋白質生産宿主として最も開発されている（K.Wolf編「Nonconventional Yeasts in Biotechnology」（1996））。その理由としては、工業レベルの培養法が確立されていること、メタノールによって制御される強力

なプロモーターを有していることが挙げられる。メチロトロフ酵母が発見されたころ、SCP (Single Cell Protein) としての利用が研究された結果、安価な（無機塩、微量元素、ビオチン、炭素源からなる）培地で、乾燥菌体重量100g/L以上の高密度培養技術が確立された。

C1化合物代謝経路の解明や、その応用利用に関する研究の結果、メタノール代謝に必要な酵素群は炭素源によって厳密に調節されていることが明らかになった。メタノール酸化性酵母におけるメタノール代謝は、最初の反応として、アルコールオキシダーゼによりメタノールと酸素からホルムアルデヒドと過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素はカタラーゼにより水と酸素に分解される。一方、ホルムアルデヒドは、ホルムアルデヒド脱水素酵素、S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ及びアルコールオキシダーゼの作用により、二酸化炭素まで酸化され、その際に生じるNADHは細胞のエネルギー源として利用される。それと同時に、ホルムアルデヒドはジヒドロキシアセトンシンターゼによりキシルロース-5-リン酸と縮合し、グリセルアルデヒド-3-リン酸とジヒドロキシアセトンへと変換され、その後ペントースリン酸経路を経て菌体構成成分となる。

これらのアルコールオキシダーゼ、ジヒドロキシアセトンシンターゼ、ギ酸脱水素酵素はグルコースで培養した菌体では検出されないが、メタノールで培養した菌体には、それぞれ菌体内蛋白質の数10%を占めるまでに誘導される。これら酵素の生産は転写レベルで制御されるため、これらをコードする遺伝子のプロモーターの支配下で目的とする外来遺伝子の誘導発現が可能となる。メタノール代謝酵素遺伝子プロモーターを用いた外来遺伝子発現系は生産量の点で酵母発現系のなかでも最も高く評価されており、菌体内発現では総蛋白質の数10%程度、分泌の場合で培地中に数g/Lまで発現した例もある。

現在のところ、メチロトロフ酵母で形質転換系及び外来遺伝子発現系が確立しているのは、Ocandida boidinii、Hansenula polymorpha、Pichia pastoris、Pichia methanolicaの4種である。それぞれの発現系において使用コドン頻度、発現調節、発現プラスミドの組み込み様式の点で差が認められ、それぞれの発現系の特色となっている。

ところで自然界に存在する蛋白質には、アミノ酸のみからなる単純蛋白質と、

糖鎖や脂質、リン酸などが結合した複合蛋白質の2種類があり、サイトカイン類に関してはそのほとんどが糖蛋白質であることが知られている。近年、糖鎖の構造については、レクチンを用いた解析等の従来の方法に加え、HPLCやNMR、FAB-MASを用いた新しい分析法等が開発され、次々と新しい糖蛋白質の糖鎖構造が解明されてきている。一方、糖鎖の機能解析の研究により、糖鎖は細胞間認識、分子識別、蛋白質の構造維持や活性への寄与、生体内でのクリアランス、分泌、局在化など多くの生体内機構に重要な役割を担っていることがわかってきた。

例えば、エリスロポエチン (EPO) や組織プラスミノゲン活性化因子 (TPA) などについては、その糖鎖を除くと本来の生物活性を示さなくなることが明らかにされてきた (木幡陽、蛋白質核酸酵素、36, 775-788 (1991))。遺伝子組換え体動物細胞を宿主として生産された史上初の糖蛋白質型医薬品となったエリスロポエチンについては、その糖鎖の重要性が指摘されている。エリスロポエチンの糖鎖は受容体との結合には阻害的に働くが、活性構造の保持、および体内動態の改善に決定的な寄与があり、全体として薬理活性の発現に必要不可欠であることが示された (Takeuchi and Kobata, Glycobiology, 1, 337-346 (1991))。更に、糖鎖の構造、種類、分岐数 (Man3GlcNAc2に結合するGlcNAcによって形成される枝分かれの数) とエリスロポエチンの薬理効果との間に強い相関性が見いだされた (Takeuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7819-7822 (1989))。分岐構造の発達していないエリスロポエチンでは腎でのクリアランスが早まり、結果として体内滞留時間が短くなることがこの現象の主な原因であると報告されている (Misaizu et al., Blood, 86, 4097-4104 (1995))。これに似た例はフェツインなどの血清糖蛋白質でも見られ、糖鎖の末端のシアル酸を除去することでガラクトースが露出すると、肝細胞表面のレクチンによって認識され、血中から速やかに消失してしまうことが見いだされている (Ashwell and Harford, Annu. Rev. Biochem., 51, 531-554 (1982) ; Morell et al., J. Biol. Chem., 243, 155-159 (1968))。

糖蛋白質の糖鎖には、大別して、Asn結合型 (N型)、ムチン型、O-GlcNAc型、GPIアンカー型、プロテオグリカン型などがあり (竹内誠、グリコバイオロジーシリーズ5、グリコテクノロジー、木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、講談社

サイエンティフィック、191-208 (1994))、それぞれ固有の生合成経路を持ち、個別の生理機能を担っている。このうち、Asn結合型糖鎖の生合成経路については多くの知見があり、詳しく解析されている。

Asn結合型糖鎖の生合成は、N-アセチルグルコサミン、マンノース、およびグルコースからなる前駆体が脂質キャリアー中間体の上に合成され、まず小胞体 (ER) で糖蛋白質の特定の配列 (Asn-X-SerまたはThr) に転移される。次にプロセシング (グルコース残基と特定のマンノース残基の切断) を受け、マンノース 8 残基と N-アセチルグルコサミン 2 残基からなる M8 ハイマンノース型糖鎖 (Man8GlcNAc2) が合成される。このハイマンノース型糖鎖を含有する蛋白質はゴルジ体に輸送されて、種々の修飾を受けるが、このゴルジ体での修飾は酵母と哺乳類で大きく異なっている (Gemmill, T.R., Trimble, R.B., Biochim. Biophys. Acta., 1426, 227 (1999))。

哺乳類細胞では、多くの場合ハイマンノース型糖鎖に、エキソ型で α -1, 2 マンノシド結合を切断する酵素である α -マンノシダーゼ I (α -1, 2-マンノシダーゼ) が作用してマンノース数残基を切断する。この過程で生成する糖鎖 (Man5-8GlcNAc2) は、ハイマンノース型と呼ばれる糖鎖である。マンノースが 3 残基切断された M5 ハイマンノース型糖鎖 (Man5GlcNAc2) に N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnT) I が作用し、N-アセチルグルコサミンを 1 残基転移し、GlcNAcMan5GlcNAc2 からなる糖鎖が生成する。このようにしてできた糖鎖は混成 (ハイブリッド) 型と呼ばれる。更に、 α -マンノシダーゼ II、GnT-II が作用すると、GlcNAc2Man3GlcNAc2 という複合 (コンプレックス) 型と呼ばれる糖鎖構造となり、これ以降、十数種にもおよぶ糖転移酵素群が作用して、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸等を付加し、多様な哺乳類型糖鎖を形成する (図1)。

よって本発明で定義される哺乳類型糖鎖とは哺乳類に存在する N 型 (アスパラギン結合型) 糖鎖であって、哺乳類の糖鎖生合成過程において生成される糖鎖である。具体的には Man8GlcNAc2 で示される M8 ハイマンノース型糖鎖、Man8GlcNAc2 より α -マンノシダーゼ-I の作用で生成される Man5GlcNAc2、Man6GlcNAc2、Man7GlcNAc2 で示される M5、M6、M7 ハイマンノース型糖鎖、Man5GlcNAc2 より

GlcNAc トランスフェラーゼ-I (GnT-I) の作用により生成される GlcNAcMan5GlcNAc2で示される混成型糖鎖、更にGlcNAcMan5GlcNAc2より α -マンノシダーゼ-I、GlcNAcトランスフェラーゼ-II (GnT-II) の作用により生成される GlcNAc2Man3GlcNAc2で示される2本鎖複合型糖鎖、更にGlcNAc2Man3GlcNAc2よりガラクトシルトランスフェラーゼ (GalT) の作用により生成される Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2で示される2本鎖複合型糖鎖を言う。

哺乳類ではハイマンノース型、混成型、複合型いずれの糖鎖も見られるが、蛋白質によってその結合する糖鎖が異なっていたり、また一つの蛋白質内でも型の異なる糖鎖が結合していたりする。これらの糖鎖は、その型や結合している糖鎖の種類によって糖蛋白質の生合成、細胞内ソーティング、抗原性の隠蔽、生体内安定性、臓器ターゲティング特性などの優れた機能を示す(遠藤玉夫、糖鎖工学、産業調査会、64-72 (1992))。

一方、酵母では、M8ハイマンノース型糖鎖にマンノースが数残基から100残基以上付加した、マンナン型糖鎖(外糖鎖)を生成する。例えばパン酵母、実験酵母として知られる *Saccharomyces cerevisiae*における外糖鎖の生合成は図2で示したような経路で進行すると考えられている (Ballou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3368-3372 (1990))。すなわち、M8ハイマンノース型糖鎖にまず α -1,6結合でマンノースが付加する延長開始反応が起こる(図2, 反応 I, B)。この反応を行なう酵素は *OCH1*遺伝子にコードされる蛋白質であることが明らかになっている (Nakayama et al., EMBO J., 11, 2511-2519 (1992))。更に α -1,6結合でマンノースを逐次延長する反応(図2, II)が起こることにより、外糖鎖の骨格となるポリ α -1,6結合マンノース結合が形成される(図2, E)。この α -1,6結合のマンノースには、 α -1,2結合したマンノースの分岐が存在し(図2: C, F, H)、この枝分かれした α -1,2結合のマンノースの先には、更に α -1,3結合したマンノースが付加することがある(図2: D, G, H, I)。この α -1,3結合のマンノースの付加は、*MNN1*遺伝子産物によるものである (Nakanishi-Shindo et al., J. Biol. Chem., 268, 26338-26345 (1993))。またハイマンノース型糖鎖部分および外糖鎖部分にマンノース-1-リン酸が付加した酸性糖鎖も生成することがわかっている(図2, * ; 前記式 (I) 中の*に対応

するリン酸化可能部位)。この反応はMNN6遺伝子がコードする遺伝子によることがわかっており (Wang et al., J. Biol. Chem., 272, 18117-18124 (1997))、更にこの転位反応を正に制御する蛋白質をコードする遺伝子 (MNN4) も明らかとなった (Odani et al., Glycobiology, 6, 805-810 (1996) ; Odani et al., FEBS letters, 420, 186-190 (1997))。

上記のように酵母をはじめとする微生物を用いた物質生産は、その生産コストの低さや、これまで醗酵工学として培ってきた培養技術など、動物細胞を用いた物質生産に比べると、いくつかの点で有利である。しかしながら、微生物においてはヒト糖蛋白質と同一構造の糖鎖を付加することができないという問題がある。つまり、ヒトを含め動物細胞由来の糖蛋白質は、図1で示したような複合型、さらに混成型およびハイマンノース型の3種類のアスパラギン結合型糖鎖に加え、多種多様のムチン型糖鎖を有しているが、パン酵母 (Saccharomyces cerevisiae) でも付加されるアスパラギン結合型糖鎖はハイマンノース型のみで、ムチン型はマンノースのみを主成分とする糖鎖しか付加されない。

これらの酵母の糖鎖は不均質な蛋白質産物を生成し、蛋白質の精製を困難にしたり、比活性を低下させたりする (Bekkers et al., Biochim. Biophys. Acta, 1089, 345-351 (1991))。更に糖鎖の構造が大きく異なるため、酵母で生産された糖蛋白質は、哺乳類由来のものと同一の生物活性が検出されなかったり、哺乳類動物などに対して強い免疫原性を有する。このように、哺乳類由来の有用糖蛋白質を生産させる際の宿主としては、酵母は不適當とされており、上述したエリスロポエチン等のように糖鎖が重要な機能を持っている糖蛋白質の遺伝子組換え生産には、微生物は適しておらず、実際にエリスロポエチンの生産にはチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) が用いられている。

このように糖蛋白質の糖鎖は、その構造が複雑であるだけでなく生物活性の発現に重要な役割を担っていることが予想されるが、糖鎖の構造と生物活性との相関が必ずしも明確でないため、蛋白質部分に付加する糖鎖の構造 (糖の種類、結合位置、鎖長など) を自由自在に改変制御できる技術の開発が必要となる。特に医薬品として糖蛋白質を開発する場合にはその構造および機能解析が重要である。その中で哺乳類由来のものと同等の生物活性を持った糖蛋白質、すなわち哺乳類

型の糖鎖を含有する糖蛋白質を生産できる酵母の開発が、学会や産業界から望まれている。

酵母を用いて哺乳類型糖鎖を生産するためには、まず、前記のような酵母特有の糖蛋白質糖鎖の修飾であるマンノースを多数付加するような反応がおこらず、外糖鎖が付加しなくなり、糖鎖合成がM5ハイマンノース型糖鎖を生成するような糖鎖生合成系を有する変異株を育種することが重要となる。次に、この哺乳類型糖鎖の前駆体であるM8ハイマンノース型糖鎖に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を上記酵母変異株に導入することにより達成されるはずである。

そこで、以前より外糖鎖が欠失した糖蛋白質を得るために、酵母外糖鎖生成系酵素群の欠損株の使用が*Saccharomyces cerevisiae*を中心に検討されてきている。欠損株を得るためには、薬剤や紫外線照射、自然変異により遺伝子突然変異株を取得する場合と、人為的に標的遺伝子を破壊する方法がある。

前者についてはこれまで様々な報告がある。例えば、*mnn2*変異株は外糖鎖の α -1,6骨格から α -1,2結合を生じる枝分かれのステップに欠損があり、*mnn1*変異株は分岐先端に α -1,3結合のマンノースを生成するステップに欠損がある。しかし、これらの変異株は外糖鎖の骨格である α -1,6マンノース結合には欠損がないため、いずれも鎖長の長い外糖鎖を生成する。また*mnn7, 8, 9, 10*変異株などは α -1,6マンノース結合を4-15分子程度しか持たない変異株として単離されているが、これらの変異株も外糖鎖が短くなるだけであり、ハイマンノース型糖鎖で糖鎖伸長が停止するものではない (Ballou et al., J. Biol. Chem., 255, 5986-5991 (1980) ; Ballou et al., J. Biol. Chem., 264, 11857-11864 (1989))。外糖鎖の付加欠損は、小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送が温度感受性となった*sec18*などの分泌変異株などでも観察される。しかし、*sec*変異株では、蛋白質の分泌そのものが高温で阻害されてしまうため、糖蛋白質の分泌生産という目的にはそぐわない。

よって、これらの変異株は目的のハイマンノース型糖鎖を完全には生合成できないため、哺乳類型糖鎖を生成するための宿主酵母としては不適であると考えられる。

一方、後者については近年の遺伝子工学的手法の発達により、標的遺伝子を複

数個破壊した欠損株を構築できるようになった。まず、試験管内での操作により、プラスミド上の標的遺伝子DNAを分断あるいは部分欠失させ、そこに適当な選択マーカー遺伝子DNAを挿入して標的遺伝子の上流部と下流部の間に選択マーカーがサンドイッチされた構造体を作製する。次に、この構造を持つ線状DNAを酵母細胞に導入することにより、導入断片の両端と染色体上の標的遺伝子との相同部分の間で2回の組み換えを起こし、選択マーカーを挟み込んだDNA構成体で置換するものである (Rothstein, Methods Enzymol., 101, 202-211 (1983))。

外糖鎖を欠損した酵母株の分子育種は地神らにより既に特開平6-277086や特開平9-266792に記載されている。地神らはこの α -1,6結合マンノースの伸長の鍵酵素であると考えられている *S. cerevisiae* の *OCH1* 遺伝子 (α -1,6-マンノシルトランスフェラーゼを発現する) のクローニングに成功した。この *OCH1* 遺伝子の破壊株 ($\Delta och1$) の糖蛋白質には、Man8GlcNAc2、Man9GlcNAc2、Man10GlcNAc2の3種の糖鎖が付加されており、このうちMan8GlcNAc2糖鎖は、*S. cerevisiae* と哺乳類細胞とで共通するERコア糖鎖と同一の構造 (図2中Aで記載した構造) で、Man9GlcNAc2、Man10GlcNAc2の糖鎖は、このERコア糖鎖に α -1,3結合マンノースが付加された構造 [Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K., Tanaka, A., Toda, Y. and Jigami, Y., (1994), J. Biol. Chem.] であった。さらに、 $\Delta och1mnn1$ 二重変異株を作製して末端の α -1,3結合マンノース転移を阻害することにより、*S. cerevisiae* と哺乳類細胞で共通するERコア糖鎖と同一構造のMan8GlcNAc2糖鎖のみを付加する *S. cerevisiae* 宿主を作製できた。この $\Delta och1mnn1$ 二重変異株は、ハイマンノース型糖鎖を有する哺乳類由来の糖蛋白質を遺伝子組換え技術により生産する際に有用な宿主となると考えられている [地神芳文(1994)蛋白質・核酸・酵素, 39, 657]。

しかし、特開平6-277086に記載された二重変異株 ($\Delta och1 \Delta mnn1$) で生産された糖蛋白質糖鎖には、リン酸残基を持つ酸性糖鎖が含まれていることがわかった。この酸性糖鎖はヒトなど哺乳類由来の糖鎖には存在しない構造であり、哺乳類の体内で異物と認識されて、抗原性を示すと思われる (Ballou, Methods Enzymol., 185, 440-470 (1990))。そこで、更にマンノース-1-リン酸転移を正に制御する遺伝子 (*MNN4*) およびO-結合型糖鎖の延長反応を行なうマンノース転移酵素遺

伝子 (*KRE2*) の機能を破壊した四重変異株 (特開平9-266792に記載) が構築された。これに記載された酵母株の生産する糖蛋白質の糖鎖は、目的のM8ハイマンノース型糖鎖を有していることが明らかとなった。更に千葉らはこ酵母特有の糖鎖生合成系に関わる遺伝子を破壊した酵母に *Aspergillus saitoi* 由来の α -1, 2-マンノシダーゼ遺伝子を導入した株は、マンノースが1～数残基切断されたハイマンノース型糖鎖 (Man5-8GlcNAc2) を有することが明らかとなっている (Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998))。また更にこの育種された株に哺乳類の糖鎖生合成系に関わる遺伝子を導入することで、酵母により哺乳類型糖蛋白質を生産する試みを行っている (PCT/JP00/05474)。しかしながら開示された知見では構成発現プロモーターとしては最も発現量の高いと言われるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の遺伝子のプロモーターを用いて α -1, 2-マンノシダーゼ遺伝子を発現させているにもかかわらず、異種蛋白質であるFGFではハイマンノース型糖鎖 (Man5GlcNAc2) への変換率がほぼ100%であるのに対して、細胞壁由来のマンノプロテイン、及びカルボキシペプチダーゼY (CPY) のMan5GlcNAc2への変換効率は、10～30%と低く、種々の糖蛋白質への応用という面では十分であるとは言い難い。

また別途1994年、Schwientekらは *S. cerevisiae* でヒト由来 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の活性発現について報告しており [Schwientek, T. and Ernst, J. F., *Gene*, 145, 299 (1994)]、Krezdrnらも同じく *S. cerevisiae* でヒト由来 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ及び α -2, 6-シアルトランスフェラーゼの活性発現を行っている。[Krezdrn, C. H., et al., *Eur. J. Biochem.* 220, 809 (1994)]。

しかしながら、これらの知見を他の酵母に応用しようとした場合、種々の問題点が生じてくる。まず酵母と一言にいても、様々な糖鎖構造を有することが知られている (Nonconventional Yeasts in Biotechnology, (1995) K. Wolfら)。

例えば、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はガラクトースを含有する。*Kluyveromyces lactis* はGlcNAcを有する。メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* や、病原性酵母である *Candida albicans* は β マンノシド結合を有する糖鎖が確認されている。またキシロース、ラムノースを糖鎖構成成分として有する酵母も存在し

ている (Biochim. et Biophys. Acta, 1426 1999, 227-237)。

事実、地神らの報告にある Saccharomyces cerevisiae 以外、哺乳類型糖鎖を生産する酵母は得られておらず、外来蛋白質生産の宿主として有用であるメチロトロフ酵母に関しては、特開平9-3097の例が挙げられるが、その他はほとんど存在していない。

特開平9-3097では Pichia pastoris の OCHI 遺伝子ホモログ、及びその破壊株を得て天然型メチロトロフ酵母株に比して糖鎖伸長能が抑制されてなる修飾メチロトロフ酵母株を作成しているが、生産された糖蛋白質のSDS-PAGEの情報しかなく、構造解析などの根拠がない。つまり α -1,6マンノシルトランスフェラーゼである可能性について指摘しているだけで、実際に活性を同定しているわけではない。事実、Saccharomyces cerevisiae においても OCHI 遺伝子ホモログである HOCI 遺伝子 (GenBank登録番号 ; U62942) が存在するが、現在のところその活性、機能は不明である。

また P. pastoris においては β マンノシド結合を有する糖鎖が確認されており、その構造については何ら記載がない。実際に糖鎖構造解析を行って、生成した糖鎖は同定されていないので、取得した遺伝子が実際に OCHI 遺伝子であるかどうか、また更に破壊株の糖鎖が哺乳類型となったという証明はなされておらず、特開平9-3097により開示された技術では哺乳類型糖鎖糖蛋白質を作成するとは言えず、医薬品生産に適応できる生産系としては十分であると言えない。

また、酵母以外の微生物を利用した哺乳類型糖鎖の生産に関する試みとして、Marasらによる糸状菌 Trichoderma reesei を用いた検討がある (US5,834,251)。これは糸状菌、酵母に α -1,2-マンノシダーゼ、GnT-Iを作用させハイブリッド型糖鎖 (GN1Man5型糖鎖) を合成するといったものである。

糸状菌は元々 α -1,2-マンノシダーゼを発現しており、その結果酵母と比較して糖鎖修飾が少ないと言われている。一方酵母には特有の外糖鎖が付加されるので、該手法のように α -1,2-マンノシダーゼのみを導入しただけでは、全ての糖鎖がMan5にはならない。事実、該特許に開示されている Saccharomyces cerevisiae においても上記地神、千葉らの知見にあるように外糖鎖合成遺伝子 OCHI の作用により最終生成物であるMan5と部分分解物であるMan6以上の糖鎖の混

合物になり、哺乳類型糖鎖を生成しているとは言い難く、よって酵母の糖鎖生合成遺伝子の破壊なしには目的を達成できることはない。Marasらはこれら酵母特有の糖鎖生合成系の遺伝子破壊については全く言及しておらず、該手法が酵母 (*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) まで適応できないことは自明である。またMarasらは実施例の中で異種発現蛋白質としてRNaseBを挙げているが、RNaseBは本来Man5またはMan6のハイマンノース型糖鎖を有するものである。動物細胞由来の糖鎖の多くは複雑な構造を有する複合型糖鎖であり、医薬品などへの応用が期待されているサイトカインなどの糖蛋白質の多くは複合型糖鎖を有する。事実、発現する外来糖蛋白質の種類によってその糖鎖構造が大きく異なる事が知られている (Method in Molecular Biology 103, 1998, 95-105)。よって複合型糖鎖を有する糖蛋白質への応用について元々ハイマンノース型糖鎖を有する糖蛋白質であるRNaseBを例とするのは不適であると考えられる。

また更に糸状菌は工業用酵素、食品酵素の製造などによく用いられ、形質転換系も整備されてきており、組換え技術による酵素生産も行われている。しかし

- 1) プロテアーゼ活性が非常に強いため、できた蛋白が限定分解を受けやすい、
- 2) 菌体外に多くの分泌蛋白を生産するため、均一性が求められる蛋白性医薬品の生産には不適である。

なお本発明における *Ogataea minuta* はもと *Pichia minuta* または *Hansenula minuta* と称されていた株で、緒方らにより *Ogataea minuta* と命名された (Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 58, 1245-1257 (1994))。 *Ogataea minuta* は他のメチロトロフ酵母同様、メタノールによる誘導時にアルコールオキシダーゼ、ジヒドロキシアセトンシンターゼ、ギ酸脱水素酵素を菌体内に著量生産するが、これらのメタノール資化に関する遺伝子についての情報、更に該酵母の糖鎖構造については全く知られていない。

本発明の課題は、酵母での糖蛋白質の生産における上記の問題を克服し、ヒトおよび他の哺乳類細胞において付加されるのと同じの糖鎖構造をもつ、抗原性のない有用な哺乳類型糖鎖、および該糖鎖を含有する糖蛋白質を、メチロトロフ酵母を用いて大量に製造する方法を提供することにある。

発明の開示

そこで本発明者らはメチロトロフ酵母を用いた哺乳類細胞適応型糖鎖構造を有する糖蛋白質生産技術の構築を目的に、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた。その結果、メチロトロフ酵母の一種である *Ogataea minuta* の糖鎖が主に α -1,2-マンノシド結合よりなることを、細胞壁糖鎖のNMR解析、及び α 1,2-マンノシダーゼ消化試験により見出し、*Ogataea minuta* の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株 (M8ハイマンノース型糖鎖に α -1,6結合でマンノースが順次結合する伸長反応のキー酵素と考えられる *OCHI* 遺伝子 (α -1,6-マンノシルトランスフェラーゼ) 破壊株など) にメタノール誘導性プロモーターなどの強力なプロモーターの支配下にて α 1,2-マンノシダーゼを導入・発現させ、更に異種遺伝子を導入した *Ogataea minuta* を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質が得られることを見出し本発明に至った。つまり *Saccharomyces cerevisiae* における *MNN1* 遺伝子、*MNN4* 遺伝子を破壊することなく、哺乳類型糖鎖を生産することができることを見出した。

すなわち、本発明は、

- 1) メチロトロフ酵母の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株 (M8ハイマンノース型糖鎖に α -1,6結合でマンノースが順次結合する伸長反応のキー酵素と考えられる *OCHI* 遺伝子 (α -1,6-マンノシルトランスフェラーゼ) 破壊株など) にメタノール誘導性プロモーターなどの強力なプロモーターの支配下にて α -1,2-マンノシダーゼを導入・発現させることによつて得られる哺乳類型糖鎖を産生するメチロトロフ酵母株。
 - 2) また該糖鎖生合成変異酵母株を用いて、これに異種遺伝子を導入発現させた酵母株を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を生産する方法。
 - 3) 更に該生産法により製造される哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質。
- である。

より具体的には、本発明は以下の 1 ~ 122 を提供する。

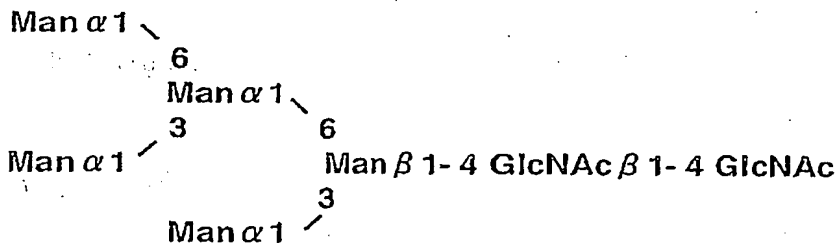
1. 哺乳類型糖鎖を製造し得るメチロトロフ酵母の作製方法であつて、

1) メチロトロフ酵母における α -1,6-マンノシルトランスフェラーゼをコードするOCHI遺伝子を破壊する工程、及び

2) α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、を含む、上記方法。

2. 哺乳類型糖鎖が下記構造式 ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) によって示される、上記1に記載の方法。

構造式2



3. メチロトロフ酵母が Pichia、Hansenulla、Candida、または Ogataea 属に属する酵母である、上記1または2に記載の方法。

4. メチロトロフ酵母が Ogataea minuta である、上記1または2に記載の方法。

5. メチロトロフ酵母が Ogataea minuta IF010746株由来の株である、上記1～4のいずれかに記載の方法。

6. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子をメタノール誘導性プロモーターの制御下において発現させる、上記1～5のいずれかに記載の方法。

7. メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子のプロモーターである、上記6に記載の方法。

8. アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子が Ogataea minuta 由来の遺伝子である、上記7に記載の方法。

9. 導入する α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子に酵母小胞体 (ER) 滞留シグナル (HEDL) を付加することを特徴とする、上記1～8のいずれかに記載の方法。

10. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子が Aspergillus saitoi 由来の遺伝子であ

る、上記 1～9 のいずれかに記載の方法。

1 1. 更に異種遺伝子を導入する工程を含む、上記 1～10 のいずれかに記載の方法。

1 2. 発現ベクターを用いて異種遺伝子を導入して発現させる、上記 1 1 に記載の方法。

1 3. 発現ベクターがメタノール誘導性プロモーターを含む、上記 1 2 に記載の方法。

1 4. メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子のプロモーターである、上記 1 3 に記載の方法。

1 5. アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子が Ogataea minuta 由来の遺伝子である、上記 1 4 に記載の方法。

1 6. 発現ベクターがグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子由来のプロモーターを含む、上記 1 2 に記載の方法。

1 7. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質の N 型糖鎖の 20% 以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、上記 1 1～1 6 のいずれかに記載の方法。

1 8. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質の N 型糖鎖の 40% 以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、上記 1 1～1 6 のいずれかに記載の方法。

1 9. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質の N 型糖鎖の 60% 以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、上記 1 1～1 6 のいずれかに記載の方法。

2 0. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質の N 型糖鎖の 80% 以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、上記 1 1～1 6 のいずれかに記載の方法。

2 1. 異種遺伝子のコードする蛋白質がヒト由来である、上記 1 1～2 0 のいずれかに記載の方法。

2 2. 異種遺伝子のコードする蛋白質が抗体またはその断片である、上記 1 1～2 1 のいずれかに記載の方法。

23. 上記1～22のいずれかに記載の方法によって作製されるメチロトロフ酵母。
24. 上記23に記載のメチロトロフ酵母を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質を生産する方法。
25. 上記24に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質。
26. 実質的に配列番号16で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (URA3) 遺伝子DNA。
27. 実質的に配列番号15で示される塩基配列からなる URA 3 遺伝子DNA。
28. 実質的に上記26または27に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。
29. 上記28に記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea minuta 株。
30. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、上記29に記載の Ogataea minuta 株。
31. 実質的に配列番号28で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、ホスホリボシル-アミノ-イミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素 (ADE1) 遺伝子DNA。
32. 実質的に配列番号27で示される塩基配列からなる ADE1 遺伝子DNA。
33. 実質的に上記31または32に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。
34. 上記33に記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea minuta 株。
35. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、上記34に記載の Ogataea minuta 株。
36. 実質的に配列番号100で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、イミダゾール-グリセロール-リン酸-デヒドラターゼ (HIS3) 遺伝子DNA。
37. 実質的に配列番号99で示される塩基配列からなる HIS3 遺伝子DNA。

38. 実質的に上記36または37に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

39. 上記38に記載の組換え発現ベクターによって形質転換されたOgataea minuta株。

40. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、上記39に記載のOgataea minuta株。

41. 実質的に配列番号108で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (LEU2) 遺伝子DNA。

42. 実質的に配列番号107で示される塩基配列からなるLEU2遺伝子DNA。

43. 実質的に上記41または42に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

44. 上記43に記載の組換え発現ベクターによって形質転換されたOgataea minuta株。

45. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、上記44に記載のOgataea minuta株。

46. 実質的に配列番号43に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、 α -1,6マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子をコードするOCH1遺伝子DNA。

47. 実質的に配列番号42で示される塩基配列からなるOCH1遺伝子DNA。

48. 上記46または47に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

49. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、上記48に記載のOgataea minuta株。

50. 実質的に配列番号52で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、プロテイナーゼA (PEP4) 遺伝子DNA。

51. 実質的に配列番号51で示される塩基配列からなるPEP4遺伝子DNA。

52. 上記50または51に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

53. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、上記52に記載のOgataea minuta株。

54. 実質的に配列番号58で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴

とする、プロテイナーゼB (PRBI) 遺伝子DNA。

5 5. 実質的に配列番号 5 7 で示される塩基配列からなる PRBI 遺伝子DNA。

5 6. 上記 5 4 または 5 5 に記載の遺伝子が破壊された Ogataea minuta 株。

5 7. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、上記 5 6 に記載の Ogataea minuta 株。

5 8. 実質的に配列番号 1 1 6 で示されるアミノ酸配列をコードすることの特徴とする、YPSI 遺伝子DNA。

5 9. 実質的に配列番号 1 1 5 で表される塩基配列からなる YPSI 遺伝子DNA。

6 0. 上記 5 8 または 5 9 に記載の遺伝子が破壊された Ogataea minuta 株。

6 1. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、上記 6 0 に記載の Ogataea minuta 株。

6 2. 上記 6 0 または 6 1 に記載の Ogataea minuta 株に、異種遺伝子を導入し、該遺伝子のコードする蛋白質を製造する方法。

6 3. 異種遺伝子が抗体またはその断片をコードする遺伝子である上記 6 2 に記載の方法。

6 4. メチロトロフ酵母の YPSI 遺伝子を破壊することによって、抗体またはその断片の分解を抑制する方法。

6 5. メチロトロフ酵母が Ogataea minuta 株である、上記 6 4 に記載の方法。

6 6. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、上記 6 5 に記載の方法。

6 7. 抗体のクラスが IgG である、上記 6 4 ~ 6 6 に記載の方法。

6 8. IgG のサブクラスが IgG1 である、上記 6 7 に記載の方法。

6 9. 抗体がヒト抗体である、上記 6 4 ~ 6 8 のいずれかに記載の方法。

7 0. 実質的に配列番号 6 4 で示されるアミノ酸配列をコードすることの特徴とする、KTRI 遺伝子DNA。

7 1. 実質的に配列番号 6 3 で示される塩基配列からなる KTRI 遺伝子DNA。

7 2. 上記 7 0 または 7 1 に記載の遺伝子が破壊された Ogataea minuta 株。

7 3. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、上記 7 2 に記載の Ogataea minuta 株。

7 4. 実質的に配列番号 7 0 で示されるアミノ酸配列をコードすることの特徴

とする、MNN9遺伝子DNA。

75. 実質的に配列番号69で示される塩基配列からなるMNN9遺伝子DNA。

76. 上記74または75に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

77. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、上記76に記載のOgataea minuta株。

78. 実質的に配列番号78で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子DNA。

79. 実質的に配列番号77で示される塩基配列からなる、AOX遺伝子DNA。

80. 実質的に配列番号79で示される塩基配列からなるアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX) のプロモーターを含むDNA。

81. 実質的に配列番号80で示される塩基配列からなる、アルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX) のターミネーターを含むDNA。

82. 上記80に記載のプロモーターを含むDNA、異種遺伝子、及び上記81に記載のターミネーターを含むDNAを含む遺伝子発現カセット。

83. 上記82に記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

84. 上記83に記載の組換え発現ベクターによって形質転換されたOgataea minuta株。

85. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、上記84に記載のOgataea minuta株。

86. 実質的に配列番号6で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子DNA。

87. 実質的に配列番号5で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子DNA。

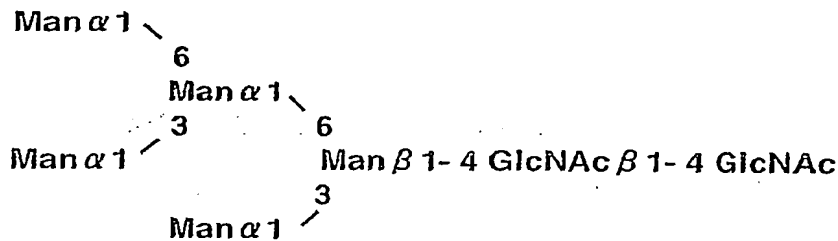
88. 実質的に配列番号7で示される塩基配列からなるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (GAPDH) のプロモーターを含むDNA。

89. 実質的に配列番号8で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (GAPDH) のターミネーターを含むDNA。

90. 上記88記載のプロモーターを含むDNA、異種遺伝子、及び上記89記載のターミネーターを含むDNAを含む遺伝子発現カセット。

- 9 1. 上記 9 0 記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。
- 9 2. 上記 9 1 記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea minuta 株。
- 9 3. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、上記 9 2 に記載の Ogataea minuta 株。
- 9 4. 哺乳類型糖鎖が下記構造式 (Man5 GlcNAc2) :

構造式 2



によって示される、哺乳類型糖鎖を製造し得る Ogataea minuta 株の作製方法であ
って、

Ogataea minuta 株における OCH1 遺伝子 (配列番号 4 2) を破壊する工程、
を含む、上記方法。

9 5. Ogataea minuta が IF010746 株由来の株である上記 9 4 に記載の方法。

9 6. さらに、

配列番号 1 5 で示される塩基配列を有する URA 3 遺伝子、配列番号 2 7 で示され
る塩基配列を有する ADE1 遺伝子、配列番号 9 9 で示される塩基配列を有する HIS3
遺伝子および配列番号 1 0 7 で示される塩基配列を有する LEU2 遺伝子からなる群
から選ばれる少なくとも一つ以上の遺伝子を破壊する工程、
を含む、上記 9 4 または 9 5 に記載の方法。

9 7. さらに、

配列番号 5 1 で示される塩基配列を有する PEP 4 遺伝子、配列番号 5 7 で示され
る塩基配列を有する PRB1 遺伝子および配列番号 1 1 5 で示される塩基配列を有す
る YPS1 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも一つ以上の遺伝子を破壊する工

程、

を含む、上記 9 4 ~ 9 6 のいずれかに記載の方法。

9 8. さらに、

配列番号 6 3 で示される塩基配列を有する KTR 1 遺伝子及び/または配列番号 6 9 で示される塩基配列を有する MNV 9 遺伝子を破壊する工程、
を含む、上記 9 4 ~ 9 7 のいずれかに記載の方法。

9 9. さらに、

Aspergillus saitoi 由来の α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、

を含む、上記 9 4 ~ 9 8 のいずれかに記載の方法。

1 0 0. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を、上記 8 3 に記載のベクターに導入して発現させる、上記 9 9 に記載の方法。

1 0 1. さらに、

PDI 遺伝子を導入して発現させる工程、

を含む、上記 9 4 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の方法。

1 0 2. PDI 遺伝子が、Saccharomyces cerevisiae 由来の遺伝子 (M62815) である、上記 1 0 1 に記載の方法。

1 0 3. PDI 遺伝子を、上記 8 3 に記載のベクターに導入して発現させる、上記 1 0 1 または 1 0 2 に記載の方法。

1 0 4. さらに、

異種遺伝子を導入して発現させる工程、

を含む、上記 9 4 ~ 1 0 3 のいずれかに記載の方法。

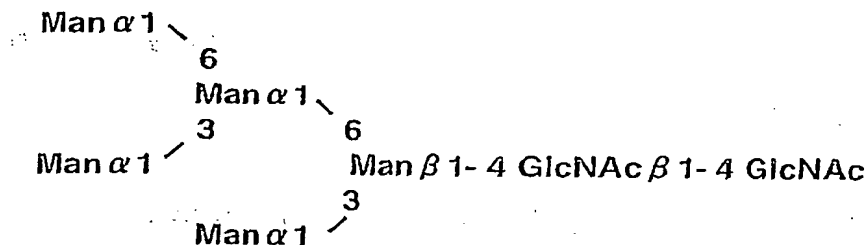
1 0 5. 異種遺伝子を上記 8 3 に記載のベクターに導入して発現させる工程、
を含む、上記 1 0 4 に記載の方法。

1 0 6. 上記 1 0 4 または 1 0 5 に記載の方法を用いて作製された Ogataea minuta を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質を生産する方法。

1 0 7. 上記 1 0 6 に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質。

108. 哺乳類型糖鎖が下記構造式 (Man5 GlcNAc2) :

構造式2



によって示される、哺乳類型糖鎖を製造し得る *Ogataea minuta* 株の作製方法であ
って、

Ogataea minuta 株における配列番号 42 で示される塩基配列を有する *OCH1* 遺伝子
を破壊する工程、及び

Ogataea minuta 株における配列番号 15 で示される塩基配列を有する *URA3* 遺伝子
を破壊する工程、及び

Ogataea minuta 株における配列番号 51 で示される塩基配列を有する *PEP4* 遺伝子
を破壊する工程、及び

Ogataea minuta 株における配列番号 57 で示される塩基配列を有する *PRB1* 遺伝子
を破壊する工程

を含む、上記方法。

109. *Ogataea minuta* 株が IF010746 株由来の株である、上記 108 に記載の
方法。

110. さらに、

配列番号 27 で示される塩基配列を有する *ADE1* 遺伝子を破壊する工程、
を含む、上記 108、または 109 に記載の方法。

111. さらに、

配列番号 63 で示される塩基配列を有する *KTR1* 遺伝子を破壊する工程、
を含む、上記 110 に記載の方法。

112. さらに、

配列番号99で示される塩基配列を有するHIS3遺伝子を破壊する工程、
を含む、上記111に記載の方法。

113. さらに、

配列番号107で示される塩基配列を有するLEU2遺伝子を破壊する工程、
を含む、上記111に記載の方法。

114. さらに、

1) 配列番号115で示される塩基配列を有するYPSI遺伝子を破壊する工程、
を含む、上記111に記載の方法。

115. さらに、

α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、
を含む、上記108～114のいずれかに記載の方法。

116. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を、上記83に記載のベクターに導入
して発現させる上記115に記載の方法。

117. さらに、

PDI遺伝子 (M62815) を導入して発現させる工程、
を含む、上記108～116のいずれかに記載の方法。

118. PDI遺伝子 (M62815) を、上記83に記載のベクターに導入して発現
させる上記117に記載の方法。

119. さらに、

異種遺伝子を導入して発現させる工程、
を含む、上記108～118のいずれかに記載の方法。

120. 異種遺伝子を上記83に記載のベクターに導入して発現させる工程、
を含む、上記119に記載の方法。

121. 上記119または120に記載の方法で作製されたOgataea minuta株
を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質
を生産する方法。

122. 上記121に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する異
種遺伝子のコードする蛋白質。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願第2002-127677号の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、哺乳類動物での一般的なN-結合型糖鎖の生合成経路を示す。

図2は、酵母 (*S. cerevisiae*) におけるN-結合型糖鎖の生合成経路を示す。図中、Mはマンノース、 $\alpha 2$ は α -1,2結合、 $\alpha 3$ は α -1,3結合、 $\alpha 6$ は α -1,6結合、および $\beta 4$ は β -1,4結合を意味する。

図3は、種々の酵母の細胞壁糖鎖のプロトンNMR分析結果を示したものである。

図4は、各種酵母の細胞壁由来マンノプロテインから調製した糖鎖を *Aspergillus saitoi* α -1,2-マンノシダーゼ（生化学工業製）により消化しHPLC（アミドカラム）で分析した結果である。

図5は、プラスミドpOMGP1、pOMGP2、pOMGP3、およびpOMGP4の制限酵素地図を示したものである。

図6は、プラスミドpOMUR1、pOMUM1、およびpDOMU1の制限酵素地図を示したものである。

図7は、*Ogataea minuta* 野生株、プラスミドpDOMU1による形質転換株、*URA3* 遺伝子破壊株の *URA3* 遺伝子座の構造、及びPCRプライマーの位置を示したものである。

図8は、プラスミドpOMAD1、およびpDOMAD1の制限酵素地図を示したものである。なお、人為的に付加した制限酵素部位には下線を施した。

図9は、プラスミドpOMUR2、およびpROMU1の制限酵素地図を示したものである。

図10は、*Ogataea minuta* 野生株、プラスミドpDOMAD1による *ADE1* 遺伝子破壊株、および *URA3* 遺伝子欠失株の *ADE1* 遺伝子座の構造、及びPCRプライマーの位置を示したものである。

図11は、プラスミドpOMOC1、pOMOC2B、pOMOC3H、およびpDOMOCH1の制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

図12は、*Ogataea minuta* 野生株、プラスミドpDOMOCH1による *OCH1* 遺伝子破

壊株、および URA3 遺伝子欠失株の OCH1 遺伝子座の構造、及びPCRプライマーの位置を示したものである。

図13は、OCH1 遺伝子破壊株である Ogataea minuta TK3-A株及び親株である Ogataea minuta TK1-3株のマンナン糖蛋白質糖鎖のアミドカラム及び逆相カラムでの構造分析結果を示したものである。

図14は、プラスミドpOMPA1、pDOMPA1の制限酵素地図、Ogataea minuta 野生株、プラスミドpDOMPA1による PEP4 遺伝子破壊株、及び URA3 遺伝子欠失株の PEP4 遺伝子座の構造を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

図15は、プラスミドpOMPBI、pDOMPBIの制限酵素地図、Ogataea minuta 野生株、プラスミドpDOMPBIによる PRBI 遺伝子破壊株、及び URA3 遺伝子欠失株の PRBI 遺伝子座の構造を示したものである。

図16は、プラスミドpOMKR1、pDOMKR1の制限酵素地図、Ogataea minuta 野生株、プラスミドpDOMKR1による KTRI 遺伝子破壊株、及び URA3 遺伝子欠失株の KTRI 遺伝子座の構造を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

図17は、プラスミドpOMMN9-1、pDOMN9の制限酵素地図、Ogataea minuta 野生株、プラスミドpDOMN9による MNN9 遺伝子破壊株、URA3 遺伝子欠失株の MNN9 遺伝子座の構造、及びPCRプライマーの位置を示したものである。

図18A及びBは、プラスミドpOMAX1、pOMAXPT1、pOMUR5、pOMUR6、pOMUR-X、pOMUR-XN、pOMex1U、pOMex2U、pOMex3G、pOMex4A、pOMex5H、pOMexGP1UおよびpOMexGP4Aの制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

図19は、Aspergillus saitoi 由来 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を発現している och1 Δ 株である Ogataea minuta TK3-A-MU1株のマンナン糖蛋白質糖鎖のアミドカラム及び逆相カラムでの構造分析結果を示したものである。

図20は、Aspergillus saitoi 由来 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子発現 Ogataea minuta OCH1 遺伝子破壊株 Ogataea minuta TK3-A-MU-IVG1株の産生する Saccharomyces cerevisiae 由来インベルターゼのアミドカラム及び逆相カラムで

の糖鎖構造解析の結果を示したものである。

図 2 1 は、Ogataea minuta TK9-IgB-aM株を用いて生産された抗体のウェスタン解析結果を示す。

図 2 2 は、Ogataea minuta TK9-IgB-aM株を用いて生産された抗体の精製結果を示す。

図 2 3 は、Ogataea minuta TK9-IgB-aM株を用いて生産された抗体のG-CSFに対する結合活性を示す。

図 2 4 は、Ogataea minuta TK9-IgB株、及びOgataea minuta TK9-IgB-aM株を用いて生産された抗体の糖鎖構造解析結果を示す。

図 2 5 は、プラスミドpOMHI1、pOMHI2、pOMHI3、pOMHI4、およびpDOMHI1の制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター、及びリンカー由来の制限酵素部位には下線を施した。

図 2 6 は、Ogataea minuta 野生株、プラスミドpDOMHI1によるHIS3遺伝子破壊株、およびURA3遺伝子欠失株のHIS3遺伝子座の構造、及びPCRプライマーの位置を示したものである。

図 2 7 は、プラスミドpOMex6HSの作成法、及びその制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター、及びリンカー由来の制限酵素部位には下線を施した。

図 2 8 は、プラスミドpOMLE1、pOMLE2、およびpDOMLE1の制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター、及びリンカー由来の制限酵素部位には下線を施した。

図 2 9 は、Ogataea minuta 野生株、プラスミドpDOMLE1によるLEU2遺伝子破壊株、およびURA3遺伝子欠失株のLEU2遺伝子座の構造、及びPCRプライマーの位置を示したものである。

図 3 0 は、プラスミドpOMex7Lの作成法、及びその制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター、及びリンカー由来の制限酵素部位には下線を施した。

図 3 1 は、プラスミドpOMYP1、pOMYP2、pOMYP3、およびpDOMYP1の制限酵素地図を示したものである。ベクター、及びリンカー由来の制限酵素部位には下線を施した。

図 3 2 は、Ogataea minuta 野生株、プラスミドpDOMLE1によるYPS1遺伝子破壊

株、および URA3 遺伝子欠失株の YPSI 遺伝子座の構造、及びPCRプライマーの位置を示したものである。

図 3 3 は、Ogataea minuta YK3-IgB-aM株を用いて生産された抗体のウエスタン解析結果を示す。

図 3 4 は、Ogataea minuta YK3-IgB-aM株を用いて生産された抗体の精製結果（ウエスタン解析、還元・非還元）を示す。

図 3 5 は、Ogataea minuta YK3-IgB-aM-PDI株を用いて生産された抗体のウエスタン解析結果を示す。

符号の説明

GlcNAc, GN : N-アセチルグルコサミン

Man, M : マンノース

PA : 2-アミノピリジル化

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明における哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質の製造法は基本的には下記の工程よりなる。

1) メチロトロフ酵母の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株（M8ハイマンノース型糖鎖に α -1,6結合でマンノースが順次結合する伸長反応のキー酵素と考えられる OCHI 遺伝子（ α -1,6-マンノシルトランスフェラーゼ）破壊株など）にメタノール誘導性プロモーターなどの強力なプロモーターの支配下にて α -1,2-マンノシダーゼを導入・発現させることによって得られる哺乳類型糖鎖を産生するメチロトロフ酵母株を育種する工程。

2) 該糖鎖生合成変異酵母株を用いて、これに異種遺伝子を導入、発現させた酵母株を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を生産する工程。

1. 哺乳類型糖鎖生産株の作成法

本発明における、酵母特有の外糖鎖生合成系遺伝子を破壊し、更に酵母特有の糖鎖が除去された哺乳類型糖鎖を生産する酵母変異株は以下のようにして作製す

ることができる。

1-1 Man5型糖鎖（ハイマンノース型糖鎖）生産酵母の作成法

本発明の酵母変異株に必要な変異形質は、酵母特有の外糖鎖生合成系遺伝子の変異であり、具体的には少なくともOCH1遺伝子に変異を有するものである。即ち、上記の変異を有する限り、自然変異株であっても人為変異株であってもよい。

OCH1遺伝子とは酵母の外糖鎖形成の初発反応を触媒する α -1,6マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であり、酵母の糖蛋白質のN型糖鎖のコア糖鎖にさらに α -1,6結合でマンノースを転移する働きを有し、この反応をきっかけとして動物細胞由来の糖蛋白質に比べて過剰にマンノースが付加し（ハイパーマンノシレーション）、酵母特有のマンナン型糖鎖が形成される。従ってOCH1遺伝子とは厳密に上記活性、機能を有する蛋白質をコードするものであり、単に遺伝子配列または該遺伝子配列より推定されるアミノ酸配列で相同性を有する遺伝子を言うものではない。

しかしながら酵母の糖鎖を哺乳類型糖鎖に変換するためには、このOCH1遺伝子を破壊する操作だけでは十分ではない。

前述のように哺乳類細胞では、ハイマンノース型糖鎖に α -マンノシダーゼ I が作用してマンノース数残基を切断し、最終的にMan5ハイマンノース型糖鎖 (Man5GlcNAc2) が生成する。このMan5型糖鎖が哺乳類型糖鎖のプロトタイプとなる糖鎖である。この糖鎖にN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnT) I が作用し、N-アセチルグルコサミンを1残基転移し、GlcNAcMan5GlcNAc2 からなるハイブリッド型糖鎖が生成し、更に順次複合型糖鎖と言われる糖鎖が生成する。よって酵母細胞にて哺乳類型糖鎖を生産させるためには、まずMan5ハイマンノース型糖鎖 (Man5GlcNAc2) を生産する酵母を作出することが前提となる。

本発明に用いられる α -1,2-マンノシダーゼ（別名、 α -マンノシダーゼ-I）は、該酵素活性を有するものであれば、特に限定はされない。例えば上述の哺乳類細胞の糖鎖生合成系でのMan5ハイマンノース型生成に関わる α -マンノシダーゼ-I、その他Nematode等の動物由来や実施例で使用されたAspergillus saitoi等の真菌由来の α -1,2マンノシダーゼを用いることができる。

本発明を効率的に達成するためには α -1,2-マンノシダーゼの発現部位が大切

である。哺乳類細胞では α -1,2-マンノシダーゼはシス側のゴルジ体の領域で機能すると言われている。一方酵母細胞での酵母特有の糖鎖の付加はシス側、ミディアアルまたはトランス側のゴルジ体で行われる。よって酵母特有の糖鎖の付加される過程よりも前、つまりゴルジ体における修飾を受ける前に α -1,2-マンノシダーゼを作用させる必要がある。発現場所が糖蛋白質の輸送経路で下流に存在するゴルジ体では効率的にMan5型糖鎖を生成することはできない。

よってこの目的には例えば α -1,2-マンノシダーゼに酵母における小胞体(ER)滞留シグナル(例えばHis-Asp-Glu-Leuで示されるアミノ酸配列)を蛋白質のC末端に付加し、ERに局在させ、活性を発現させることにより、酵母特有の糖鎖の付加を阻害することができる。この方法は本発明者らによって既に報告されている(千葉ら, J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998))。

しかしながら、該蛋白質を医薬品として用いるために哺乳類型の糖鎖に変換する場合には、酵母特有の糖鎖をほぼ完全に除去することが必要であり、上記の手法だけでは不十分と考えられる。事実、上記の千葉らの報告においても *Saccharomyces cerevisiae*での検討では、 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子の発現に該株の中で機能する最も強いプロモーターとして知られるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素のプロモーターを使用しているが、細胞壁糖蛋白質の糖鎖を解析した結果、Man5型糖鎖の生成は約10%程度しかない。

本発明における *Ogataea minuta*の糖鎖変異株を用いた系では、以下の実施例に示すように、酵母が製造する細胞壁糖蛋白質の糖鎖の20%以上、好ましくは40%以上、更に好ましくは60%以上、最も好ましくは80%以上がMan5型糖鎖になっており、かつ異種の遺伝子の分泌発現例においても、20%以上、好ましくは40%以上、更に好ましくは60%以上、最も好ましくは80%以上がMan5型糖鎖になっている。よって *Saccharomyces cerevisiae*での問題点が解決されている。この結果より、本発明の *Ogataea minuta*の様々な糖蛋白質への応用が期待される。

一方、千葉らはコア糖鎖であるMan8型糖鎖しか生成しない $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ 株を利用している。*MNN1*遺伝子は *Saccharomyces cerevisiae*に特有の遺伝子と推定されており、また糖鎖合成経路、及び糖鎖合成遺伝子が単離、解析されている

が、他の酵母では糖鎖構造について十分に解析されていない。例えば Pichia pastoris では前述のように β マンノシド結合を有する糖鎖の存在が知られている

(Higgins編、Pichia Protocols, 1998, p95-105, Humana Press、及び Biochim. et Biophys. Acta, 1426 1999, 227-237)。また特開平9-3097に開示された OCH1 遺伝子ホモログ破壊株が産生する糖蛋白質のSDS-PAGEの結果から見て、確かに糖鎖は低分子化されているデータを提示しているが、Man8型糖鎖のような単一の糖鎖を有する糖蛋白質でないことが推定される。これらの糖鎖合成に関与する遺伝子は単離されておらず、よって遺伝子の単離、破壊には多大な労力を必要とする。

よって酵母株においてMan5型糖鎖を生産させるためには α -1,2-マンノシダーゼを高発現させる必要があり、この目的には強力なプロモーターが必要となる。そこで本発明では、最強の誘導性高発現プロモーターとして知られるメチロトロフ酵母由来の(メタノール誘導性)アルコールオキシダーゼ(AOX)遺伝子プロモーターを利用することにより発明を完成した。本発明に用いられる誘導性発現プロモーターとしては、その他ジヒドロキシアセトンシンターゼ(DAS)遺伝子、ギ酸脱水素酵素(FDH)遺伝子のプロモーターも利用できるが、本発明のメチロトロフ酵母において発現し得るメタノール誘導性プロモーターであればいずれでも良く、特に限定するものではない。

よって、ER及びゴルジ体内で酵母特有の糖鎖が付加される糖鎖上の付加部位を予めトリミング(除去)することにより、酵母特有の外糖鎖生合成遺伝子を破壊することなく、哺乳類型糖鎖を生産することができ、 β マンノシド結合を形成する遺伝子、リン酸マンノースを付加する MMN 遺伝子などの取得が不要になる。

しかしながら OCH1 については酵母でかなり普遍的に存在し、コア糖鎖の比較的還元末端側に存在するため、活性を除去するために遺伝子を破壊する必要があると考えられる。

本発明に応用される酵母株としては、糖蛋白質の糖鎖が主に α -1,2マンノシド結合にて構成される株であれば、いかなる酵母株でもよく、本発明の対象となるメチロトロフ酵母としては、主に α -1,2マンノシド結合よりなるN-型糖鎖を有する糖蛋白質を産生する酵母であれば特に制限はないが、具体的には Ogataea minuta, Candida succiphila, Pichia pastoris, Pichia trehalophila, Pichia

methanolica, Pichia angusta, Hansenula polymorpha等が例示される。好ましくはOgataea minutaである。

よって本発明で開示された手法はコア糖鎖にOCH1遺伝子によって付加される α -1,6マンノース以外の糖鎖が直接に付加された構造を有する酵母株には適用できない。つまりコア糖鎖部分、厳密にはMan5型糖鎖部分に酵母特有の糖鎖が付加された糖蛋白質を生成する酵母株は本発明の手法を利用できない。

更に α -マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリーであるKTR遺伝子群ホモログ、例えば本発明によって見出されたOgataea minutaのKTR1遺伝子、またはゴルジ体での糖鎖付加に関与していると言われていたMNN9遺伝子ホモログ、例えば本発明によって見出されたOgataea minutaのMNN9遺伝子を補助的に破壊することにより、より効率的に哺乳類型化を達成することができよう。

また更に糖鎖変異株は一般的に糖蛋白質中の糖鎖が小さくなり、結果として細胞壁が弱くなるため糖鎖変異株は薬剤感受性が上昇したり、浸透圧に対する耐性が低下したりする。その結果、細胞の培養に課題を残す場合が考えられるが、本発明におけるメタノール誘導性プロモーターを利用し α -1,2-マンノシダーゼを発現させる手法では副生的に異種遺伝子がコードする糖蛋白質の生産と同時に哺乳類型糖鎖の生産もできるため、酵母細胞の増殖時に負担をかけることなく、培養・生産を行うことができる。

上記の「哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子」は、上記の1種または2種以上の遺伝子群に属する遺伝子を、目的とする糖鎖を生産するのに必要な数だけ導入する。導入する遺伝子が複数の場合は、それらの遺伝子が同種の遺伝子群に属していても、互いに異種の遺伝子群に属していてもよい。

生成する糖鎖、及び糖蛋白質を高収率で得るためには、上記酵素を適切な器官（例えばゴルジ体）にて高発現させることが望ましい。よって酵母のコドン使用頻度に合わせた遺伝子を用いることは有効である。また酵素を適切な器官に局在させるためには、酵母のシグナル配列等を付加することも有効である。遺伝子の導入については染色体組み込み型タイプ（YIpタイプ）等ベクターを用いる方法が考えられる。遺伝子を発現させるために必要なプロモーターはGAPDH, PGK等の構成的発現プロモーター、AOX1等の誘導発現プロモーターなど特に限定されな

い。しかし糖鎖加水分解酵素、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子を1種または複数発現させた場合には酵母の増殖に影響を及ぼすことがあるので、その場合には誘導プロモーターの使用や、遺伝子を導入する順序を考慮する必要がある。

上記の哺乳類型糖鎖を生産する酵母変異株、あるいは、該変異株に上記の外来遺伝子群を導入した変異株を、培地に培養すれば、酵母特有の外糖鎖の含量が低下し、哺乳類細胞の生産するハイマンノース型糖鎖 ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$)、混成型糖鎖 ($\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$)、複合型糖鎖 ($\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 等) と同一の Asn 結合型糖鎖を含有する糖蛋白質を、酵母細胞内または細胞外に生産させることができる。

具体的には、該変異株に GnT-I 遺伝子を導入することにより、混成型糖鎖を生産させることができ、また、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子 (α -マンノシダーゼ II、GnT-II、GalT、UDP-GlcNAc Transporter、UDP-Gal Transporter 遺伝子) を導入することにより、二本鎖複合型糖鎖 ($\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$) を生産させることができる。

2 本発明における *Ogataea minuta* の各種遺伝子

本発明の蛋白質はそれぞれその活性を有するものであれば特に制限されないが、実質的に下記実施例に記載の配列番号にて示されるアミノ酸配列を有する蛋白質である。本明細書において「実質的に配列番号〇〇で示されるアミノ酸配列」とは、

(a) 配列番号〇〇で示されるアミノ酸配列、及び

(b) 配列番号〇〇で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

を含むことを意味する。すなわち、該アミノ酸配列は、上述の特性を変更しない範囲で、一部が修飾 (例えば、アミノ酸残基またはペプチド鎖の置換、欠失、挿入または付加等) されていてもよい。ここで、アミノ酸の欠失、置換若しくは付加の数としての数個とは、当分野において通常用いられる方法によって導入できる範囲であり、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個、更に好ましくは2~3個である。

本発明の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAは、前述の本発明の

Ogataea minutaに由来する蛋白をコードする塩基配列を有することを特徴とするものである。かかる塩基配列は、本発明の蛋白質をコードし得る塩基配列であれば特に制限されないが、実質的に下記実施例に記載の配列番号で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列が例示される。本明細書において「実質的に配列番号〇〇で示される塩基配列」とは、

(a) 配列番号〇〇で示される塩基配列、及び

(b) 配列番号〇〇で示される塩基配列において1若しくは数個のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加された塩基配列

を含むことを意味する。該DNAは、従来公知の手法により製造することができる。例えば、本発明で例示する塩基配列をもとにDNA合成機を用いてその一部または全てのDNAを合成したり、染色体DNAを用いてPCR法で増幅させることにより製造することも可能である。ここで、ヌクレオチドの欠失、置換若しくは付加の数としての数個とは、例えば当分野において通常用いられる部位特異的突然変異誘発導入法（例えばMolecular Cloning, A Laboratory manual, 第二版, Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997))を用いて導入できる範囲を意味し、例えば2～10個、好ましくは2～5個、より好ましくは2～3個を意味する。

3. 遺伝子取得法

標的遺伝子断片の単離は、一般的手法 (Molecular Cloning(1989), Methods in Enzymology 194(1991)) にしたがって酵母株よりからゲノムDNAを抽出し、目的遺伝子を選別することにより可能である。上記において、Ogataea minutaからのゲノムDNAの抽出は、例えば、Cryer らの方法 (Methods in Cell Biology, 12, 39-44 (1975)) およびP. Philippsenらの方法 (Methods Enzymol., 194, 169-182 (1991)) に従って行なうことができる。

例えば酵母のプロトプラストを調製して、当該プロトプラストから、通常公知のDNA抽出法、高塩濃度下での細胞残さ除去後のアルコール沈殿法、フェノールやクロロホルム抽出後のアルコール沈殿法等の常法を用いて行なうことができる。なお、上記の予めプロトプラストを調製する方法の他に、ガラスビーズ等による

細胞破碎法等によってもDNAの抽出を行なうことが出来るが、高分子量のDNAを調製することが容易であるという点から上記プロトプラスト法を行なうのが好ましい。

標的遺伝子の取得は、例えばPCR法（PCR Technology. Henry A. Erlich, Atockton press(1989)）によって行なうことができる。PCR法は、インビトロ（in vitro）でDNAの特定断片をその領域の両端のセンス・アンチセンスプライマー、耐熱性DNAポリメラーゼ、DNA増幅システム等の組み合わせを用いて約2～3時間で数十万倍以上に増幅できる技術であるが、標的遺伝子の増幅には、プライマーとして25～30merの合成1本鎖DNAを、鋳型としてゲノムDNAを用いる。増幅された遺伝子は塩基配列を確認することにより、用いることができる。

遺伝子のDNA配列の決定等は通常の方法、例えばジデオキシ法（Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467. (1977)）等により行なうことができる。更に上記DNA塩基配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いることによっても容易に行ない得る。

DNAの単離・精製等は何れも常法、例えば大腸菌の場合、アルカリ/SDS法とエタノール沈殿によるDNA抽出、更にRNase処理、PEG沈殿法などによりDNAを精製できる。

また標的遺伝子の取得は、(a) 上記酵母の全DNAを抽出し、当該DNAに由来するDNA断片を組み込んだ遺伝子導入用ベクターを宿主に導入して上記酵母の遺伝子ライブラリーを作製し、(b) ついで、かかる遺伝子ライブラリーから所望のクローンを選択して、当該クローンを増幅する、ことによっても実施することが出来る。

遺伝子ライブラリーの調製は、上記の方法にて得られた染色体DNAを適当な制限酵素（Sau3AI等）によって部分消化して断片化し、適当なベクターに連結した後、適当な宿主に形質転換することによってゲノミックライブラリーを得ることが出来る。またはまず上記のPCR法により標的遺伝子の断片を取得し、ゲノムサザン解析により標的遺伝子を効率よく取得できるような制限酵素部位を探索し、該制限酵素によって染色体DNAを消化して断片を得ることによっても可能である。この際用いられるベクターとしては、通常公知の遺伝子ライブラリー調製用ベク

ターとして知られる、pBR系統、pUC系統、ブルースクリプト(Bluescript)系統等の一般に市販されている入手可能なプラスミドを用いることも出来る。また、Charon系統やEMBL系統のファージベクター又はコスミド等も広く用いることが出来る。調製した遺伝子ライブラリー作製用ベクターで形質転換又は形質導入を行なう宿主は、上記ベクターの種類に応じたものを採用することが出来る。

クローンの選択は、上記遺伝子ライブラリーから、標的遺伝子に特有の配列を含む標識プローブを用いてコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法等により選択し、得ることが出来る。プローブに用いる標的遺伝子に特有の配列は、Ogataea minutaから精製した標的蛋白をコードする遺伝子のアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、Ogataea minutaの染色体DNAを鋳型とするPCRにより所望するDNA断片を特異的に増幅し、得ることが出来る。また他種の同種蛋白をコードする遺伝子をGenBankなどのDNAデータベース、SWISS-PROTなどの蛋白データベースより検索し、配列を入手し、BLAST等のホモロジー検索プログラム、GENETYX（ソフトウェア開発）、DNAsis（日立ソフトウェア）などの解析ソフトにて、保存されているアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、Ogataea minutaの染色体DNAを鋳型とするPCRによりDNA断片を特異的に増幅し、得ることが出来る。なお合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてもよい。塩基配列が一旦決定されると、その後は、化学合成によって、又は決定された当該塩基配列から合成したプライマーを用いたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、所望の遺伝子を得ることが出来る。

4 遺伝子破壊法

本発明において、標的遺伝子の破壊は、Rothstein, Methods Enzymol., 101, 202-211 (1983)に開示される方法に基本的に従って行い得る。具体的には、上記の方法にて得られた標的遺伝子DNAを分断あるいは部分欠失させ、そこに適当な選択マーカー遺伝子DNAを挿入して標的遺伝子の上流部と下流部の間に選択マーカーがサンドイッチされたDNA構造体を作製し、次にこの構造体を酵母細胞に導入することによって達成される。以上の操作により、導入断片（選択マーカーを挟み込んだDNA構造体）の両端と染色体上の標的遺伝子との相同部分の間で2回

の組み換えを起こし、染色体上の標的遺伝子が導入断片で置換される。ここでの遺伝子破壊に用いる選択マーカーは下記に示すような栄養要求性マーカーや薬剤耐性マーカーが用いられる。この場合1つの遺伝子を破壊するために一般的には1つの選択マーカーを要することになるが、URA3遺伝子を利用した場合、ura3形質を効率的に再生することができるので、本目的にしばしば利用される。

具体的に、OCH1遺伝子破壊株の作製を例にとり説明する。構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子を有するプラスミドを構築し、この遺伝子カセットを制限酵素で切りだし、プラスミド上の標的遺伝子に挿入し、破壊された対立遺伝子を構築する。このプラスミドを用いて染色体の標的遺伝子と置換して遺伝子破壊株を得る。染色体に挿入されたURA3遺伝子は前後に反復構造を有するため、反復配列間での相位的組み換えによりURA3遺伝子が染色体から脱落する。この脱落株の選択は5-フルオロオロト酸 (5-FOA) により行なうことができる。ura3変異株は5-FOAに耐性であり (Boeke et al., Mol. Gen. Genet., 197, 345-346 (1984); Boeke et al., Methods Enzymol., 154, 165-174 (1987))、URA⁺表現型を持つ細胞株は5-FOA培地に生育できなくなる。よって、5-FOAを加えた培地で耐性形質を持つ株を分離すれば、再びURA3遺伝子マーカーを用いての操作が可能である。従って、該手法により人為的に遺伝子破壊を行った「人為破壊株」では、元の酵母株の有する栄養要求性変異形質が遺伝子破壊操作により損なわれない。

尚、上記の手法によらず遺伝子破壊が自然に起こっている「自然変異株」では、上記の手法を用いることはないので、栄養要求性変異形質の数は増減しない。

5 遺伝子を導入するためのマーカー

また、本発明の酵母変異株における外来遺伝子を導入するための栄養要求性マーカーは、使用する酵母株に規定されるものであり、具体的にはura3変異、his3変異、leu2変異、ade1変異、trp1変異から選ばれる。栄養要求性マーカーの数は導入する遺伝子の数によるが、一般的に、1つの遺伝子を導入するのに1個の栄養要求性マーカーが必要である。複数の遺伝子を導入する場合は、導入する遺伝子断片が長く、導入効率が低下し、ひいては発現効率も低下するので、導入遺伝子の数が多いほど多数の栄養要求性マーカーが必要となる。

本発明において、栄養要求性を相補する遺伝子とは、アミノ酸、核酸等の生体

成分の合成系の遺伝子である。変異形質はこれらの遺伝子が機能しないような変異が入っているものなので、相補する遺伝子は元の機能する遺伝子そのものである。よって、元の酵母株由来の遺伝子が望ましい。

なお選択マーカーとしては、上記の栄養要求性マーカーのみならず、G418、セルレニン、オーレオバシジン、ゼオシン、カナバニン、シクロヘキシミド、ハイグロマイシン、ブラストシジン等の薬剤に対し、耐性を付与する薬剤耐性マーカーなどを使用することで、遺伝子の導入や破壊を行うことも可能である。また、エタノール等に対する溶剤耐性や、グリセロールや塩等に対する浸透圧耐性、銅等の金属イオン耐性等を付与する遺伝子をマーカーにすることで、遺伝子の導入や破壊を行うことも可能である。

6 DNAの細胞への導入および形質転換の方法

上記操作における、DNAの細胞への導入およびこれによる形質転換の方法としては、一般的な方法、例えばリチウム塩で処理して自然にDNAを取込みやすい状態にしてプラスミドを取り込ませる方法（Ito et al., Agric. Biol. Chem., 48, 341 (1984)）や、あるいは電氣的にDNAを細胞内に導入する方法、プロトプラスト法（Creggh et al., Mol. Cell. Biol., 5, 3376 (1985)）、等を採用できる（Becker and Guarente, Methods Enzymol., 194, 182-187 (1991)）。本発明の発現ベクターは宿主染色体DNAに組み込まれ、安定に存在させることが出来る。

7 異種遺伝子の発現

ここでいう「異種遺伝子」とは、発現の対象となる遺伝子であり、Ogataea minuta由来のアルコールオキシダーゼ、またはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素とは異なる任意の遺伝子を意味する。異種遺伝子としては、例えば、酸性フォスファターゼ遺伝子、 α -アミラーゼ遺伝子、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子等の各種酵素遺伝子、インターフェロン α 、インターフェロン γ 等の各種インターフェロン遺伝子、IL1, IL2等の各種インターロイキン遺伝子、エリスロポエチン（EPO）遺伝子、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）遺伝子等の各種サイトカイン遺伝子、成長因子遺伝子、各種抗体遺伝子等が挙げられる。これらの遺伝子はいかなる手法によって得られるものでもよい。

本発明を効率的に利用するためには哺乳動物細胞、特にヒトに由来する細胞が産生する糖蛋白質をコードする遺伝子が用いられる。つまり本発明の目的は哺乳類、特にヒトと同一または類似の糖鎖構造を有する糖蛋白質を生産することであるため、蛋白質分子上に糖鎖構造を有する糖蛋白質に対して有効である、更に医薬上有用な生理活性蛋白質に対して適用される。その中には抗体も含まれる。抗体は古くから医薬品としての利用がなされてきたが、ヒト以外の他起源由来のものであったため、投与された抗体自身に対する抗体が産生され、複数回の投与ができず、その利用が制限されてきた。近年、抗原結合部位以外のアミノ酸配列をヒト抗体由来の配列に置換したヒト型抗体が作成されるようになり、更にマウスにヒト抗体遺伝子を導入したヒト抗体生産マウスが作出され、完全ヒト抗体が利用されるになり、抗体の医薬としての利用が急速に広まってきた。現在これらの抗体はハイブリドーマや抗体をコードする遺伝子が導入されたCHO細胞などの培養細胞に導入し生産されているが、生産性、安全性などの点で問題が多い。よってこれらの問題を克服できる酵母での生産が期待されている。しかしながら抗体分子には少なくともN型糖鎖が2ヶ所、各々の重鎖に付加された糖蛋白質であり、酵母で抗体を生産した場合、酵母特有の糖鎖が付加されてくる。この糖鎖自体、前述のように抗原性を有したり、生理活性を低下させる作用を有する。よって酵母で生産される抗体を医薬品として利用する場合には該糖鎖の哺乳類型化は避けては通れない。

一方、糖鎖の還元末端側のGlcNAcに付加される α -1,6フコースの除去によりADCC活性の高い抗体の作成法が報告されている(PCT/JP00/02260)。この α -1,6フコースの付加に関わる遺伝子として α -1,6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子(*FUT8*)が知られているが、該遺伝子は動物細胞に普遍的に存在し、本酵素活性を欠落した細胞、または人為的に該遺伝子を破壊した細胞を用いない限り、作成した抗体の一部の分子については必ず α -1,6フコースが付加されている。

しかしながら酵母には一般的にはフコースの合成系はなく、 α -1,6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子(*FUT8*)も存在していないので、人為的な遺伝子破壊なしに α -1,6フコースのない糖蛋白質を生産することができる。よって自ら高活性の抗体が生産できるであろう。

酵母でのFab、ScFvなどの抗体断片の高生産については報告があるが、完全長の抗体の高生産についての報告はほとんどない。Fab、ScFvなどの抗体断片は抗体重鎖に存在するFc領域を有していないため、抗体特有の生理活性である抗体依存性細胞障害活性（ADCC）、補体依存性細胞障害活性（CDC）を有さず、医薬品としての利用が制限されている。抗体は計14箇所のジスルフィド（S-S）結合を有しており、酵母細胞内で抗体全長が高生産できないのは分子が適切にホーリングできないためと考えられる。この原因は明らかではないが、抗体重鎖に付加されているN型糖鎖の構造の違いに起因している可能性は否定できない。よって本発明の哺乳類型糖鎖生産酵母を利用することにより、効率的に適切な立体構造を有する抗体分子を生産できる可能性がある。また分子シャペロンであるProtein Disulfide Isomerase（PDI）の導入により機能的な抗体を高生産することができるであろう。尚、本発明においては、完全な抗体分子を生産することも可能であるが、上記した抗体断片あるいは目的の機能を有する限りにおいて他の抗体断片を生産することも可能である。また、抗体としては、特に限定するものではないが、哺乳類型、特に好ましくはヒトの抗体の枠組みに他の哺乳類の抗体の抗原結合部位を導入したヒト化抗体またはヒト抗体が挙げられる。また、特に限定するものではないが、発現させる抗体のクラスとしては、IgGであることが好ましく、サブクラスとしては、IgG1であることが好ましい。

また異種タンパク質を遺伝子組み換え法によって生産する場合、目的産物が宿主由来のプロテアーゼによって分解されることがある。そのような場合、目的タンパク質の生産量が減少し、また不均一な目的タンパク質が生成し、かつタンパク質分解産物の混入により目的タンパク質の精製が困難となる。

このような問題を回避するために、組換え体を培養する培地のpHを調整することによりプロテアーゼ作用を阻害する等の、目的タンパク質を分解するプロテアーゼ活性を阻害するような培養方法が検討されている。しかしながらこの方法はある種の異種タンパク質を発現する宿主酵母の増殖に影響を与えるであろうし、細胞外でのタンパク質の分解にのみ効果的である。

Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris、Candida boidiniiにおいてプロテイナーゼA、プロテイナーゼBを不活性化した株をプロテアーゼ欠損株として

用いることにより、菌体内及び菌体外タンパク質生産を増加させたという例が示されている（特表平6-506117、Weis, H. M. ら、FEBS Lett., 377, 451(1995), Inoue, K. ら、Plant Cell Physiol., 38(3), 366(1997)、特開2000-78978）。

プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは液胞に局在するプロテアーゼで、それぞれPEP4遺伝子、PRB1遺伝子によってコードされている。酵母Saccharomyces cerevisiaeの研究によれば、プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは自分自身やカルボキシペプチダーゼYなどの別のプロテアーゼを活性化する（vandenHazel, H. B. ら、YEAST, 12, 1(1996)）。

また一方でYapsinはゴルジ体、細胞膜に広く存在するプロテアーゼで、Saccharomyces cerevisiaeの研究によれば、 α ファクターのプロセッシング酵素として知られるKEX2遺伝子がコードするタンパクのホモログとして単離された。現在までにYapsin1 (Aspartic proteinase 3、YAP3)、Yapsin 2 (Aspartic proteinase MKC7)、Yapsin 3、Yapsin 6、Yapsin 7等の遺伝子が認められている（Egel-Mitani, M. ら、Yeast 6 (2), 127-137 (1990)、Komano, H. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (23), 10752-10756 (1995)、Saccharomyces Genome Database (SGD)より）。このうちYapsin1はYPS1遺伝子によりコードされている。

Saccharomyces cerevisiaeにおいてYapsin1を不活性化した株をプロテアーゼ欠損株として用いることにより、菌体内及び菌体外タンパク質生産を増加させたという例が示されている（M. Egel-Mitani ら、Enzyme and Microbial Technology, 26, 671(2000)、Bourbonniais, Y. ら、Protein Expr. Purif., 20, 485(2000)）。

本発明によるプロテアーゼ活性の低下したPEP4遺伝子欠失Ogataea minuta株、PEP4PRB1遺伝子欠失Ogataea minuta株、及びPEP4PRB1YPS1遺伝子欠失Ogataea minuta株は、栄養培地を用いた培養条件下で野生株と同等の増殖能力を保持しているおり、異種タンパク質生産のための優れた宿主である。よって当該酵母はプロテアーゼ感受性の高い抗体などの異種タンパク質を、その分解を抑制することによって効率的に生産することができる。

8 異種遺伝子の発現カセットの構築

蛋白質生産のための有用な発現系は、種々の方法により作製することができる。

蛋白質発現ベクターは、転写の読み枠の方向に、少なくともプロモーター領域、蛋白質をコードするDNA及び転写ターミネーター領域を有するものである。これらのDNAは、所望の糖蛋白質をコードするDNAがRNAに転写されるように、お互いに機能するように関連して配列される。

本発明において使用し得る高発現プロモーターは、好ましくはメタノール誘導発現プロモーターであり、例えばOgataea minuta のアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子プロモーター、Ogataea minuta のジヒドロキシアセトン シンターゼ (DAS) 遺伝子プロモーター、Ogataea minuta のギ酸脱水素酵素 (FDH) 遺伝子プロモーターなどが挙げられる。

構成発現プロモーターとしては、Ogataea minuta のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子プロモーター、Ogataea minuta のホスホグリセロキナーゼ (PGK) 遺伝子プロモーターなどが挙げられる。

また転写ターミネーターは、プロモーターからの転写に対して転写終結を起こす活性を有する配列であればよく、プロモーターの遺伝子と同じもしくは異なるものであってもよい。

本発明の一態様として、本発明者等は、(1)メタノール誘導発現カセットして Ogataea minuta が有するアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子、構成的発現カセットしてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子の塩基配列をそのプロモーター、ターミネーターと共に取得し、(2)プロモーター、ターミネーターを単離し、(3)発現ベクターを構築し、さらに(4)本発現ベクターを用いて形質転換細胞を作製し、異種遺伝子を発現させた時、Ogataea minuta 由来の遺伝子と同様にその発現がなされることを確認した。具体例としてアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子由来のプロモーター、ターミネーターを用いる異種遺伝子の発現カセットについて以下に述べる。

8-1 アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子クローニング

本発明の発現カセットを取得するため、まずアルコールオキシダーゼ遺伝子のクローニングを行う。その出発材料としては、酵母、例えばOgataea minuta IF010746株が例示される。遺伝子クローニング方法は上記に示した方法にて行う

ことができる。

8-2 プロモーター領域、ターミネーター領域の単離

プロモーター領域、ターミネーター領域を取り出すには、制限酵素を用いて切り出すことも可能でもあるが、一般的に都合の良い制限酵素部位が適切な位置に存在するとは限らない。そこで、コーディング領域の制限酵素部位からエンド型 DNA 分解酵素によってプロモーターの方向に削って行き、適当なところまで削れたクローンを探す方法もある。最近では予め制限酵素認識部位を末端に設けたプライマーを用い、PCR で所望のプロモーター領域、ターミネーター領域を増幅し取得することが容易である。

また、これらの領域を化学合成することも可能であるし、一部の領域を化学合成しクローン化した DNA と制限酵素部位を利用して半合成のプロモーターやターミネーターを作製することも可能である。

配列番号 79 にプロモーター領域を含む配列、配列番号 80 にターミネーター領域を含む配列を例示するが、本質的に転写活性を保持する配列であればこの配列に限定されるものではなく、欠失、挿入、置換、付加などによってその塩基配列を改変することが可能である。

なお、塩基配列の改変は、公知の突然変異導入法（例えば宝酒造社の TAKARA LA PCR in vitro Mutagenesis kit を用いた方法）等により行うことが出来る。またプロモーター領域を広範囲に欠失させる場合は、例えば、市販のデレーション用キット（宝酒造社のキロシークエンス用デレーションキット）を用いて、PCR により調製するのが適当である。

8-3 発現ベクターの構築

本発明の発現ベクターは、AOXプロモーター、異種構造遺伝子、AOXターミネーター、マーカー遺伝子、相同領域を適当なベクターに挿入することによって得られる。そのため使用されるベクターとしては、特に限定するものではないが、前記 pBR 系統、pUC 系統、ブルースクリプト系統等の大腸菌プラスミドベクターが例示される。発現ベクターの構成成分をベクターに挿入することは、後記実施例の記載を参照して、あるいは慣用の技術により当業者が容易に実施することが可能である。選択マーカー遺伝子、相同領域は当業者が容易に決めることが出来る。

マーカー遺伝子として、上述のG-418、ハイグロマイシン等の抗生物質耐性遺伝子、URA3、ADE1（ホスホリボシル-アミノ-イミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素）、HIS3（イミダゾール-グリセロール-リン酸-デヒドラターゼ）、LEU2（3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素）等の栄養要求性相補遺伝子が例示される。

また異種構造遺伝子に酵母細胞で機能する分泌シグナル配列をコードするDNAを付加してもよく、この発現系によれば、糖蛋白質が宿主細胞外に分泌産生されるため、所望の糖蛋白質を容易に単離精製することができる。分泌シグナル配列としては、Saccharomyces cerevisiae 由来 α -接合因子（ α MF）の分泌シグナル配列、Saccharomyces cerevisiae 由来インベルターゼ（SUC2）の分泌シグナル配列、ヒト由来 α -ガラクトシダーゼの分泌シグナル配列、ヒト由来抗体軽鎖の分泌シグナル配列、などが挙げられる。

作成された発現ベクターは染色体組み込み型のベクターであり、染色体へ組み込むことによって目的の遺伝子が導入される。栄養要求マーカー型のベクターの場合は、該マーカー遺伝子部分を制限酵素により切断し一本鎖にし、形質転換を行い、一般的には染色体上の対立遺伝子の部分に導入される。また薬剤耐性マーカーの場合、対立遺伝子が存在しないため、発現プロモーターまたはターミネーター領域を制限酵素により切断し一本鎖にし、形質転換を行い、一般的には染色体上の該領域の部分に導入される。一旦導入された遺伝子は染色体上に存在するので、安定的に保持される。

8-4 発現ベクターの利用

本発明のAOXプロモーターを利用した発現ベクターは α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子、及び目的とする異種遺伝子の発現に有効だけでなく、その他の遺伝子の発現にも有効である。別種の選択マーカーを結合した発現ベクターを用いることにより、何度も導入することができ、複数の遺伝子の高発現が達成できる。

例えば、酵母はカビ等と比較して本来分泌蛋白質を多く生成する宿主ではない。よって分泌機構が充実していないことが予想される。事実、上述のように本来酵母における抗体の生産性は低い。

よって分泌効率を向上させるために分子シャペロンなどを導入し、高発現する

場合にも有効である。

9 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質の生産

上記の糖鎖を持つ異種生物由来の糖蛋白質を生産させるためには、上記酵母変異株を宿主として、異種遺伝子（cDNAなど）を上記の酵母で発現出来るプロモーターの下流に接続した遺伝子を作製し、相同組換えによって上記酵母宿主に組み込むか、或いは、プラスミドに挿入して上記宿主を形質転換することにより、上記宿主の形質転換体を作製し、これを公知の方法により培養することにより、酵母細胞内または細胞外に生産された異種遺伝子がコードする糖蛋白質を回収し、精製することにより得られる。

上記哺乳類型糖鎖生産酵母変異株は野生酵母株とほぼ同等の増殖能力を保持しており、該酵母変異株の培養は、酵母の培養に慣用される常法に従って行なうことができる。例えば、Difco社から供給される各種の培地成分を添加し、かつプラスミドの複製・保持に必要なマーカーによって供給可能となるアミノ酸を除いた合成培地（炭素源、窒素源、無機塩類、アミノ酸、ビタミン等を含む）等を利用できる（Sherman, Methods Enzymol., 194, 3-57 (1991)）。

メタノール誘導性プロモーターを用いた発現ベクターにより異種遺伝子を発現、目的の遺伝子発現産物を生産するための培養培地には、酸素原子又は窒素原子を有し、かつ該原子に結合する炭素数1の置換基を少なくとも1つ有する化合物を含むものを添加することが出来る。例えば、酸素原子を有する化合物としてメタノールを添加することができ、窒素原子を有する化合物としてメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、及びN-置換メチルを有するアンモニウム化合物（例えばコリン等）からなる群から選ばれる少なくとも一種を添加することが出来る。

例えば炭素源としてメタノールを含む他、酵母エキス、トリプトン、肉エキス、カザミノ酸、アンモニウム塩等の一種以上の窒素源に、リン酸、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、銅、マンガン、コバルト等の無機塩類を添加し、更に必要により各種ビタミン、ヌクレオチド等の微量栄養素、誘導前の細胞増殖のために糖質原料を便宜添加したものが挙げられる。具体的にはYPM培地（0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ペプトン、0.5%メタ

ノール)、BYPM培地(0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ペプトン、0.5%メタノール、0.1Mリン酸緩衝液pH6.0)、BM培地(0.67%酵母ニトロゲンベース、0.5%メタノール、0.1Mリン酸緩衝液pH6.0)等が挙げられる。

一方構成的発現プロモーターを用いた発現ベクターにより異種遺伝子を発現、目的の遺伝子発現産物を生産するための培養培地には、細胞増殖に適した培地を用いればよく、例えばYPD培地(1%イーストエキストラクト、2%ペプトン、2%グルコース)等の天然培地、SD培地(0.67%酵母ニトロゲンベース、2%グルコース)等の合成培地が用いられる。栄養要求マーカーを有する酵母株については、相補する栄養素を上記培地に加えればよい。

培地のpHは、5.5~6.5に調整するのが適当である。また、培養温度は15~30℃、好ましくは28℃前後である。抗体のように立体構造が複雑な蛋白質な場合、細胞内でそのフォールディングをより効率的に行うために、低温で培養することが好ましい。培養時間は、24~1000時間程度であり、培養は静置、振とう、攪拌、通気下の回分培養または連続培養等により実施することが出来る。

上記の培養物(培養液、培養菌体)から異種遺伝子の発現産物を単離精製するためには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。又、培養上清に生産された場合は、培養液そのものを用いることが出来る。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する。異種遺伝子の発現産物の分解を抑制するためにプロテアーゼ欠損株を用いることが、有効である。該無細胞抽出液または上清を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法により精製標品を得ることができる。即ち、プロタミン処理等による核酸の除去、硫酸、アルコール、アセトン等を添加して分画する、沈殿法、DEAEセファロース、Qセファロース等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-セファロースFF(ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、His Bindレジン(Novagen社製)などのキレートカラム、

ProteinAセファロース、Blueセファロースなどの群特異的吸着色素を結合したレジジン、ConAセファロースなどのレクチンカラムなどを用いたアフィニティークロマトグラフィー法、逆相クロマトグラフィークロマトフォーカシング法、等電点電気泳動、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。しかし、上記培養法、精製法は一例であって、これに限定されるものではない。

なお、精製された遺伝子産物が有するアミノ酸配列の確認は、公知のアミノ酸分析、例えばエドマン分解法による自動アミノ酸配列決定法等により行うことが出来る。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は本発明の技術的範囲を何等限定するものではない。本発明の実施例で用いるプラスミド、制限酵素等の酵素、T4DNAリガーゼ及び他の物質は市販のものであり、常法に従って使用することできる。DNAのクローニング、塩基配列の決定、宿主細胞の形質転換、形質転換細胞の培養、得られる培養物からの酵素の採取、精製等に用いられた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

なお、各種遺伝子の制限酵素地図における制限酵素サイトについては以下の略号で示してある。Ac; AccI、Ap; ApaI、B1; BalI、Bm; BamHI、Bg; BglII、Bt; BtgI、Bw; BsiWI、Cl; ClaI、RI; EcoRI、RV; EcoRV、TI; EcoT22I、Hc; HincII、Hd; HindIII、Kp; KpnI、Nd; NdeI、Nh; NheI、Nt; NotI、Pf; PflMI、Pm; PmaCI、Ps; PstI、Sc; SacI、Sl; SalI、Sm; SmaI、Sp; SpeI、Sh; SphI、Su; StuI、St; StyI、Xb; XbaI、およびXh; XhoIである。

〔実施例1〕 哺乳類型糖鎖生産に適したメチロトロフ酵母の選択

メチロトロフ酵母を用いて哺乳類型糖鎖生産酵母を育種するためには、メチロトロフ酵母特有の糖鎖合成遺伝子をクローニング、不活化する必要がある。上述のように酵母の糖鎖構造はその種類により大きく異なる。つまり糖鎖生合成に関与する酵素、遺伝子も異なってくる。よって酵母特有の糖鎖を除去するために関

与する遺伝子を破壊する場合、第一に遺伝子の単離を行う必要があるが、非常に多くのステップを踏む必要がある。そこで、そのようなステップができるだけ少なくてすむメチロトロフ酵母を選択することとした。選択の指標として酵母細胞壁のNMRのデータ（図3）（P. A. J. Gorinら編、Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 23, 367-417 (1968)）より、 α -1,2マンノシド結合に由来する4.3ppm付近のシグナルを主としたピークとして有し、かつ α -1,3マンノシド結合に由来する4.4ppm付近のシグナルを有さず、その他4.5ppm以上のシグナルを有さない育種に適した株の1次選択を行い、更に菌体より細胞表層のマンノプロテイン由来N-結合型糖鎖を抽出し α -1,2-マンノシダーゼ消化、HPLCによる分析による2次選抜を行った。2次選抜を行ったメチロトロフ酵母にはCandida succihila IFO 1911株、Ogataea minuta IFO10746株を使用した。同時に糖鎖の非還元末端に α 1,3マンノシド結合を有するSaccharomyces cerevisiae、及び前述のNMRのデータで4.5ppm以上にピークを有するメチロトロフ酵母であるCandida boidinii ATCC48180株を対象として分析に供した。

上記菌株を含むYPD培地50 mlを500 ml容坂口フラスコに入れ、30℃で24～48時間培養し、菌体を遠心分離によって集め、10 mlの100 mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）に懸濁し、オートクレーブ中で121℃、1時間加熱した。冷却後、遠心分離し、上清を取り、固形物は、もう一度10 mlの水を加えて同様に加熱、遠心分離し、上清を集めた。全抽出液を合わせて、3倍量のエタノール中に注加した。生じた白色の沈殿物を乾燥させた。これをコンカナバリンA（ConA）カラム用緩衝液（0.15 M塩化ナトリウム、0.5 mM塩化カルシウムを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2））に溶解し、ConA-アガロースカラム（0.6 x 2 cm、ホーネンコーポレーション社製）に供し、ConAカラム用緩衝液で洗浄後、0.2 Mの α -メチルマンノシドを含むConAカラム用緩衝液で溶出を行なった。コンカナバリンAはC-3, C-4, C-6位の水酸基が未置換の α -D-マンノース残基を2残基以上含む糖鎖に対して親和性を示すレクチンであり、これをカラムに固定することで、酵母細胞壁多糖であるグルカンやキチンなどとマンナン蛋白質を分離することができる（Peat et al., J. Chem. Soc., 29 (1961)）。得られた画分を透析し、凍結乾燥を行なってマンナン蛋白質を得た。

次に得られたマンナン蛋白質に対し、酵素処理を施しAsn結合型糖鎖を切りだした。すなわち、凍結乾燥標品を100 μ lのN-グリコシダーゼF用緩衝液(0.5% SDS, 0.35% 2-メルカプトエタノールを含む0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH8.0))に溶解し、5分間煮沸処理をした。室温まで戻した後、50 μ lの7.5% Nonidet P-40、138 μ lのH₂O、12 μ lのN-glycosidase F(ベーリンガー社製)を加え、37°C、16時間処理した。BioRad AG501-XSカラムで脱塩後、等量のフェノール:クロロホルム(1:1)を加え激しく振盪して、界面活性剤と蛋白質を除去し、糖鎖調製品とした。

得られた糖鎖を蛍光標識(ピリジルアミノ化、PA化という)するため、以下の操作を行なった。糖鎖調製品を濃縮乾固後、40 μ lのカップリング試薬(552 mgの2-アミノピリジンを200 μ lの酢酸に溶解した)を加え、密封し、90°C、60分処理した。室温まで戻した後、140 μ lの還元試薬(200 mgのボラン・ジメチルアミン複合体を50 μ lのH₂Oと80 μ lの酢酸に溶解した)を加え、密封し、80°C、80分処理した。反応後、アンモニア水を200 μ l加えた後、さらに等量になるようにフェノール:クロロホルム(1:1)を加え、激しく振盪してPA化オリゴ糖を含む水層を回収した。これを7回繰り返して、未反応の2-アミノピリジンを除去した。上清について0.22 μ mのフィルターで濾過し、PA化オリゴ糖調製品とした。

得られた糖鎖をAspergillus saitoi α -1,2-マンノシダーゼ(生化学工業製)により消化した後、HPLCを用いて分析を行った。アミドカラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその鎖長によって分離することが可能である。HPLCの条件は以下の通りである。

カラム: TSK-Gel Amido-80 (4.6 x 250 mm、東ソー製)

カラム温度: 40度

流速: 1 ml/min

溶出条件: A: 200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 65%アセトニトリル

B: 200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 30%アセトニトリル

0分 A=100% 50分A=0%の直線濃度勾配

励起波長: 320nm

蛍光波長: 400nm

その結果を図4に示す。その結果、Ogataea minuta、及びCandida succiphila由来のN結合型糖鎖は α -1,2-マンノシダーゼ処理によって、Man5もしくはMan6の単位まで低分子化することがわかり、OCHI遺伝子の不活化と α -1,2-マンノシダーゼ発現によって、Saccharomyces cerevisiaeにおけるoch1、mnn1、mnn4株相当の糖鎖変異株（Man5生産株）の育種が可能であると考えられた。一方、Candida boidiniiについては、かなりの割合で未分解の糖鎖が残存した。これは糖鎖の末端に α -1,2マンノシド結合でないユニットが結合しているものと考えられた。またコントロールとしてのSaccharomyces cerevisiaeについても未分解の糖鎖が残存したが、これはMNN1遺伝子の作用による α -1,3マンノースの付加によるものと考えられた。

〔実施例2〕 Ogataea minutaのグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAP）遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株より GAP遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行った。

(2-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号 ; P00359) 及びPichia pastoris (GenBank登録番号 ; Q92263)由来のグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼで保存されているアミノ酸配列

AYMFKYDSTHG (配列番号1)

DGPSHKDWRGG (配列番号2)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PGP5; 5' - GCNTAYATGTTTAAARTAYGAYWSNACNCA YGG -3' (配列番号3)

PGP3; 5' - CCNCCNCKCCARTCYTTTRTGNSWNGGNCCRTC -3' (配列番号4)

プライマーPGP5はアミノ酸配列AYMFKYDSTHGに対応し、プライマーPGP3はアミノ酸配列DGPSHKDWRGGに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

YPD培地（酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%、pH6.0）で定常期まで培養したOgataea minuta IF010746株の菌体より、酢酸カリウム法（Methods in yeast genetics.(1986) Cold Spring Harbor Laboratory, Cols Spring Harbor, New York.）によって染色体DNAを調製した。

得られたOgataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPGP5、PGP3を用いて、Ex Taqポリメラーゼ(宝酒造社)によるPCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で45秒) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.5kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン社) を用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、BigDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ社)を用いて塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae 及びPichia pastoris由来のGAP遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.5kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(2-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNAをHybond N+ナイロンメンブレン(アマシャム社)にトランスファーした。実施例(2-1)で得られたDNA断片をメガプライマーDNAラベリングシステム(アマシャム社)を用いて放射性標識し、サザンハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションは、常法(Molecular cloning 2nd edn., ed. Sambrook, J., et al., Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A., 1989)に従って行った。その結果、約6kbのHindIII-EcoRV断片にGAP遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIとEcoRVで切断し、アガロース電気泳動後、6kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIとHincIIで切断したpUC118とライゲーションした後、Hanahanの方法(Gene, 10, 63 (1980))で大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約4000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた11個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMGP1を保持するクローンを選抜した。

(2-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMGP1 (図5)のHindIII-BamHI領域をdouble-stranded Nested

Deletion Kit (ファルマシア社) を用いた欠失変異体及びプライマーウォーキング法により、塩基配列を決定した。得られた塩基配列をつなぎ合わせるにより、配列番号 5 に示す塩基配列が得られた。

配列番号 5 の塩基配列には、1492番目から始まり、2502番目で終わる1011塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列 (配列番号 6) と、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* 由来のグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼとの相同性を調べたところ、それぞれ77%、81%のアミノ酸が同一であった。

〔実施例 3〕 GAP遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った発現カセットの構築

Ogataea minuta の GAP 遺伝子プロモーター (配列番号 7) とターミネーター (配列番号 8) との間に、外来遺伝子を導入する発現カセットを作製した。実施例 2-2 記載の pOMGP1 から 3.2kb の HindIII-BamHI 断片を単離し、pBluscript II SK- の HindIII-BamHI 間に導入した。得られたプラスミドを pOMGP2 と命名した (図 5)。pOMGP2 から 3kb の HindIII-KpnI 断片を単離し、EcoRI 部位を平滑末端処理した pUC19 の HindIII-KpnI 間に導入した。得られたプラスミドを pOMGP3 と命名した (図 5)。GAP 遺伝子プロモーターとターミネーターとの間に SalI、EcoT22I 部位を導入するため、プライマー 5'-GTTTGAATTCACCTCAATTAACATACACAAATACAATACAAAGTCGACAAAAATGCATGTGGATAGATGACC AATGGGCTCTTTAAGTAAACATTTTCGTTTTGAATATATTTTC-3' (配列番号 9) と 5'-TTTTTACTAGTACGGTACCGCTCGAATCGACACAGGAG-3' (配列番号 10) を合成した。これらプライマーを用いて、pOMGP2 を鋳型とした PCR (94℃ で 30 秒、55℃ で 1 分、72℃ で 45 秒) × 20 サイクル) を行った。増幅された約 0.6kb の DNA 断片を回収し、TOPO TA Cloning Kit を用いてクローニングした。0.6kb の挿入 DNA 断片を EcoRI-KpnI 断片として単離し、pOMGP3 の EcoRI-KpnI 間に導入した。得られたプラスミドを pOMGP4 (図 5) と命名した。pOMGP4 は SalI-EcoT22I 間に外来遺伝子を導入し得る GAP 遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを有している。

〔実施例 4〕 G418 耐性遺伝子発現カセットの構築

抗生物質G418耐性選抜による形質転換を行うためにG418耐性遺伝子（アミノグリコシドフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子）の発現カセットを含むプラスミドを構築した。実施例3で構築したpOMGP4のSalI-EcoT22I間に、プラスミドpUC4K（アマシャムファルマシア社）からXhoI-PstI断片として単離される1.1kbのG418耐性遺伝子を導入した。得られたプラスミドをpOMKmR1と命名した。

〔実施例5〕 Ogataea minutaのオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素（URA3）遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株より URA3遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(5-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号 ; K02207) 及び Pichia pastoris (GenBank登録番号 ; AF321098) 由来のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素で保存されているアミノ酸配列

GPYICLVKTHID (配列番号 1 1)

GRGLFGKGRDP (配列番号 1 2)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PUR5; 5' - GGNCNTAYATHTGYYTNGTNAARACNCAYATHGA -3' (配列番号 1 3)

PUR3; 5' - GGRTCNCCKNCCYTTNCCRAANARNCCCKNCC -3' (配列番号 1 4)

プライマーPUR5はアミノ酸配列GPYICLVKTHIDに対応し、プライマーPUR3はアミノ酸配列GRGLFGKGRDPに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPUR5、PUR3を用いて、PCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で30秒）×25サイクル）を行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO-TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.6kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(5-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(5-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約4.5kbのHindIII断片にURA3遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIで切断し、アガロース電気泳動後、4.5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIで切断したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5 α 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた3個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMUR1を保持するクローンを選抜した。

(5-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMUR1のNotI-HindIII領域(図6)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号15に示す塩基配列が得られた。

配列番号15の塩基配列には、1732番目から始まり、2529番目で終わる798塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号16)とSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素との相同性を調べたところ、それぞれ82%、75%のアミノ酸が同一であった。

[実施例6] Ogataea minuta URA3遺伝子破壊株の作製

ポップイン・ポップアウト法(Rothstein R., Methods Enzymol., 194 (1991), 281)により、Ogataea minuta URA3遺伝子破壊株を作製した。

(6-1) URA3遺伝子破壊ベクターの作製

実施例(5-2)に記載のプラスミドpOMUR1(図6)より3kbのNotI-KpnI断片を単離し、pBluescript II SK-のNotI-KpnI間に導入した。本プラスミドをNotIとStyIで切断後、平滑末端処理、セルフライゲーションすることによって、プラスミドpOMUM1(図6)を取得した。プライマー、5'-ATGGAGAAAAAACTAGTGGATATACCACC-3'(配列番号17)、5'-CTGAGACGAAAAAGATATCTCAATAAACCC-3'(配列番号18)を用いて、プラスミド

pHSG398（宝酒造社）を鋳型としたPCR（（94℃で30秒、55℃で1分、72℃で45秒）×20サイクル）を行い、クロラムフェニコール耐性遺伝子の一部を増幅した。得られた0.4kbの増幅DNA断片をSpeIとEcoRV切断した後、pOMUM1のSpeI-RcoRV間に導入した。得られたプラスミドをpOMUM2と命名した。

実施例4で作製したGAP遺伝子プロモーター、ターミネーターによるG418耐性遺伝子発現カセットを有するプラスミドpOMKmR1を、HindIIIで切断し、平滑末端処理後、KpnIリンカーとライゲーションした。本プラスミドよりG418耐性遺伝子発現カセットを3kbのKpnI断片として単離し、pOMUM2のKpnIに導入した。得られたプラスミドをpDOMU1と命名した（図6）。

(6-2) 形質転換

実施例(6-1)で構築したpDOMU1をSalIで切断し、*Ogataea minuta* IF010746株に電気パルス法にて形質転換した。YPD培地で一晚30℃にて前培養し、100mlのYPD培地に植菌して30℃にて対数増殖期（OD₆₀₀ = 1.5程度）にまで8～16時間培養した。1400 × gで5分間の遠心分離により集菌し、菌体を100mlの氷冷した滅菌水で1回、続いて40mlの氷冷した滅菌水で1回洗浄した。菌体を20mlのLCバッファー（100mM LiCl、50mM カリウムリン酸バッファー pH 7.5）に懸濁し、30℃で45分間振盪した後、0.5mlの1M DTTを添加し、さらに15分間振盪した。氷冷したSTMバッファー（270mM sucrose、10mM Tris-HCl バッファー pH 7.5、1mM MgCl₂）80mlで洗浄した後、320 μlのSTMバッファーに懸濁した。電気パルスによる形質転換実験はバイオラッド社のジーンパルサーを用いて行なった。50 μlの菌体懸濁液と5 μlのDNA試料とを混合した後、0.2cmのディスポーザブルキューベットに入れ、適当な条件（電圧；1.0～1.5kv、抵抗；200～800Ω）の電気パルスを加えた。パルス後、1mlの氷冷した1Mソルビトールを含むYPD培地を加え、30℃で4～6時間振盪培養した。培養後、菌液を400～1000 μg/mlのG418を含むYPD選択培地に塗布した後、プレートを30℃で培養しして、形質転換体コロニーを得た。

URA3遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した（それぞれのプライマーの位置は図7参照）

DU5； 5'-AGGAAGAAGAGGAGGAAGAGGAAGAAAC-3' （配列番号 1.9）

DUC5; 5'-CGATGCCATTGGGATATATGAACGGTGG-3' (配列番号 20)

DU3; 5'-CCGTGTTTGAGTTTGTGAAAAACCAGGGC-3' (配列番号 21)

DUC3; 5'-TGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCC-3' (配列番号 22)

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーDU5、DUC5を用いて、PCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分) × 25サイクル) を行った。図7に示すように、プラスミドが *URA3* 座に組み込まれた株からは、1.1kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸 (5-FOA) に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の取得は実験書 (Methods Enzymol., 154 (1987), 164) に記載の方法に従った。5-FOA耐性株の染色体DNAをを鋳型とし、プライマーDU5、DU3を用いたPCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分) × 25サイクル)、プライマーDU5、DUC5を用いたPCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分) × 25サイクル)、DU3、DUC3を用いたPCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分) × 25サイクル) を行った。図7に示すように、G418耐性遺伝子が欠落し、*URA3* 遺伝子のORFがクロラムフェニコール耐性遺伝子部分領域に置換された株から、プライマーDU5、DU3を用いたPCRより2.6kb、プライマーDU5、DUC5を用いたPCRより1.1kb、プライマーDU3、DUC3を用いたPCRより1.0kbの増幅DNA断片が検出された。該酵母を *Ogataea minuta* TK1-3 株 (*ura3* Δ) と命名した。

〔実施例7〕 *Ogataea minuta* の *ADE1* (ホスホリボシル-アミノ-イミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素) 遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株より *ADE1* 遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(7-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号M61209) 及び *Candida maltosa* (GenBank登録番号; M58322) 由来の *ADE1* 遺伝子産物で保存されているアミノ酸配列FVATDRISAYDVIM (配列番号 23)

QDSYDKQFLRDWLT (配列番号 24)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PAD5; 5'-TTYGTNGCNACNGAYMGNATHWSNGCNTAYGAYGTNATHATG-3' (配列番号 25)

PAD3; 5' - GTNARCCARTCNCKNARRAAYTGYTTRTCRTANSWRTCYTG-3' (配列番号 26)

プライマーPAD5はアミノ酸配列FVATDRISAYDVIMに対応し、プライマーPAD3はアミノ酸配列QDSYDKQFLRDWLTに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPAD5、PAD3を用いて、PCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.7kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びCandida maltosa由来のADE1遺伝子産物のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。

0.7kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(7-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(7-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約5kbのHindIII-BamHI断片にADE1遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIとBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIとBamHIで切断したpBluescript II SK-とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた9個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMAD1を保持するクローンを選抜した。

(7-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMAD1のEcoRV-SmaI領域(図8)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号27に示す塩基配列が得られた。

配列番号27の塩基配列には、939番目から始まり、1850番目で終わる912塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディング

グフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号28）と *Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* 由来の *ADE1* 遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ69%、74%のアミノ酸が同一であった。

〔実施例8〕 Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、ADE1遺伝子を破壊した。

(8-1) ADE1遺伝子破壊ベクターの作製

図8に示すように、ADE1構造遺伝子の約70bp領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMAD1を作製した。ADE1遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。実施例5に記載のURA3遺伝子領域を有するプラスミドpOMUR1を鋳型とし、
 プ ラ イ マ ー 5'-
 CCCCAGCTCAAAAAAAGGTACCAATTTTCAGCTCCGACGCCGGAGCCCACTACGCCTAC-3'（配列番号29）、 GCGAAGCTTCCCCAGTTGTACACCAATCTTGTCGACAG-3'（配列番号30）を用いて、PCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で45秒）×20サイクル）を行い、URA3構造遺伝子上流領域を増幅した。増幅された約0.8kbのDNA断片を回収し、SacIとHindIII切断した後、pUC18のSacI-HindIII間に導入した。

得られたプラスミドのSacI-KpnI間にpOMUR1から単離した3.3kbのSacI-KpnI断片を導入した。得られたプラスミドをKpnI切断、平滑末端処理、セルフライゲーションした。得られたプラスミドをpOMUR2と命名した(図9)。pOMUR2をStyI切断、平滑末端処理、BglIIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドをpROMU1と命名した。pROMU1をBglIIとHindIIIで切断して得られる3.3kbのDNA断片には、URA3構造遺伝子の前後に約0.8kbの反復配列が存在することになる(図9)。

実施例7に記載のADEI遺伝子領域を有するプラスミドpOMAD1を鋳型とし、プライマー Dad1-5 ; 5'-AAAAAGCGGCCGCTCCCGGTGTCCCGCAGAAATCTTTATGCGTAGTCTTG-3' (配列番号 3、1) 、 Dad1-3 ; 5'-CCCCGGATCCTTTTTTTTAAGCTTGTGTA CTCTCCATGCACTTCCGGTGATG-3' (配列番号 3、2) を用いたPCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル)、プ

ラ イ マ ー Dad2-5 ; 5'-
 TTTTCACCCCGTCAAGGATCCCTGAACAAGGCGAACACGACGAAAAACATTTCCCCCGAG-3' (配列番号 33)、 Dad2-3 ; 5'-TTTTTGGGCCCACCTGGGTGAAGATTTGCCAGATCAAGTTCTCC-3'

(配列番号 34) を用いたPCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル) を行った。増幅されたそれぞれ約0.7kb、1kbのDNA断片を回収し、それぞれNotIIとBamHI、及びBamHIとApaIで切断した。得られたNotI-BamHIとBamHI-ApaIの両DNA断片をpBluescript II SK-のNotI-ApaI間に導入した。得られたプラスミドのBamHI-HindIII間にpROMU1から単離した3.3kbのBglIII-HindIII断片を導入した。得られたプラスミドをpDOMAD1と命名した (図8)。

(8-2) 形質転換

実施例(8-1)で得られたpDOMAD1をApaIとNotIで切断して、実施例(6-2)で得られた*Ogataea minuta* TK1-3株 (*ura3 Δ*) に電気パルス法で形質転換を行った。*ade1*形質を示す株はアデニン生合成中間代謝産物の赤色色素を産生する。よってコロニーが赤く染まることから、形質転換体よりコロニーが赤く染まる株を選択した。これらの株の*ADE1*遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した (それぞれのプライマーの位置は図10参照)

DA5; 5'- GATGCTTGCGCCTTCAACCACATACTCCTC-3' (配列番号 35)

DA3; 5'- AAAAGTTCTTGACAGCCTCAATATTGACC-3' (配列番号 36)

DOU5; 5'-ATCGATTTTCGAGTGTGTTGTCCAGGTCCGGG-3' (配列番号 37)

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーDA5、DOU5を用いて、PCR (94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分) ×25サイクル) を行った。図10に示すように、プラスミドが*ADE1*座に組み込まれた株からは、1.6kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸 (5-FOA) に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーDA5、DA3を用いたPCR (94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分) ×25サイクル) を行った。図10に示すように、*URA3*遺伝子が欠落した株から、2.9kbの増幅DNA断片が検出された。この*ura3 Δ ade1 Δ* 株を*Ogataea minuta* TK4-1株と命名した。

[実施例9] *Ogataea minuta* の*OCH1*遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株より OCH1 遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(9-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号 ; P31755) 及び Pichia pastoris (特開平9-3097) 由来の OCH1 遺伝子産物で保存されているアミノ酸配列 PQH(R)I(V)WQTWKV (配列番号 38)

WYARRIQFCQW (配列番号 39)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

POH5; 5' - CCNCARCRYRTHHTGGCARACNTGGAARGT -3' (配列番号 40)

POH3; 5' - CCAYTGRCARAAYTG DATNCKNCKNGC RTACCA -3' (配列番号 41)

プライマーPOH5はアミノ酸配列PQH(R)I(V)WQTWKVに対応し、プライマーPOH3はアミノ酸配列WYARRIQFCQWに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPOH5、POH3を用いて、PCR ((94℃で30秒、50℃で1分、72℃で30秒) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.4kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片に Saccharomyces cerevisiae 及び Pichia pastoris 由来の OCH1 遺伝子産物のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.4kbの挿入DNA断片は、プラスミドを (EcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(9-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(9-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約5kbのXbaI断片に OCH1 遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをXbaIで切断し、アガロース電気泳動後、5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をXbaIで切断したpBluescript II SK-とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた4個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMOC1を保持するクローンを選抜した。

(9-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMOC1のBglII-SpeI領域(図11)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号42に示す塩基配列が得られた。

配列番号42の塩基配列には、508番目から始まり、1812番目で終わる1305塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号43)とSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のマンノース転移酵素OCH1遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ42%、29%のアミノ酸が同一であった。特開平9-3097に開示されたPichia pastoris由来のOCH1遺伝子とのアミノ酸の相同性が29%であること、Pichia pastoris由来のOCH1遺伝子がSaccharomyces cerevisiae由来のOCH1遺伝子(α -1,6マンノシルトランスフェラーゼ)の活性を有するかどうか調べられていないこと等より、特開平9-3097に開示されたPichia pastoris由来のOCH1遺伝子が実質的にOCH1遺伝子(α -1,6マンノシルトランスフェラーゼ)をコードしているのかどうか、また本実施例及び実施例10及び11に記載したOgataea minutaのOCH1遺伝子の機能を有するかどうかについては不明である。

〔実施例10〕 Ogataea minutaのOCH1遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、OCH1遺伝子を破壊した。

(10-1) OCH1遺伝子破壊ベクターの作製

OCH1遺伝子の約0.5kbのBalI-SmaI領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMOCH1を作製した(図11)。OCH1遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、実施例(8-1)に記載した構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。

pOMOC1より4.4kbのNotI-XbaI断片を単離し、pBluescript II SK-のNotI-XbaI間に導入した。得られたプラスミドをpOMOC2と命名した。pOMOC2をAccIとXhoIで

切断し、平滑末端処理、セルフライゲーションした。得られたプラスミドをpOMOC3と命名した。pOMOC2をB_{al}I切断し、BamHIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドをpOMOC2Bと命名した（図11）。pOMOC3をSmaI切断し、HindIIIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドをpOMOC3Hと命名した（図11）。pOMOC2BのBamHI-HindIII間に実施例(8-1)に記載したpROMU1から単離した3.3kbのBglIII-HindIII断片を導入した。得られたプラスミドのHindIII-ApaI間にpOMOC3Hから単離した1.5kbのHindIII-ApaI断片を導入した。得られたプラスミドをpDOMOCH1と命名した（図11）。

(10-2) 形質転換

実施例(10-1)で得られたpDOMOCH1をApaIとNotIで切断して、実施例(6-2)で得られたOgataea minuta TK1-3株 (ura3 Δ)、及び実施例(8-2)で得られたOgataea minuta TK4-1株 (ura3 Δ adel Δ 株) に電気パルス法で形質転換を行った。形質転換は実施例(6-2)に記載の方法に順じて行った。

OCH1遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した（それぞれのプライマーの位置は図12参照）

D03; 5'-CCATTGTCAGCTCCAATTCTTTGATAAACG-3' (配列番号44)

D0U5; 5'-ATCGATTTTCGAGTGTTTGTCCAGGTCCGGG-3' (配列番号37)

D05; 5'-ACACTTCCGTAAGTTCCAAGAGACATGGCC-3' (配列番号45)

D03-2; 5'-TCACCACGTTATTGAGATAATCAAACAGGG-3' (配列番号46)

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーD05、D0U5を用いて、PCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分）×25サイクル）を行った。図12に示すように、プラスミドがOCH1座に組み込まれた株からは、2.4kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸（5-FOA）に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーD03、D05を用いたPCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分）×25サイクル）、プライマーD05、D03-2を用いたPCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分）×25サイクル）を行った。図12に示すように、URA3遺伝子が欠落した株から、プライマーD03、D05を用いたPCRより2.4kb、プライマーD05、D03-2を用いたPCRより0.9kbの増幅DNA断片が検出された。得られたoch1 Δ ura3

Δ 株を Ogataea minuta TK3-A株、och1 Δ ura3 Δ adel Δ 株を Ogataea minuta TK5-3株と命名した。

〔実施例11〕 Ogataea minuta OCH1遺伝子破壊株からの細胞表層マンナン蛋白質の分離とその含有糖鎖の構造解析

Ogataea minuta OCH1遺伝子破壊株TK 3-A株及びその親株であるTK 1-3株の細胞表層マンナン蛋白質の糖鎖構造解析を行った。PA化オリゴ糖の調製は実施例1に記載の方法にて行った。

調製した糖鎖を Aspergillus saitoi α-1,2-マンノシダーゼ（生化学工業製）により消化した。HPLCを用いて分析を行った。アミドカラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその鎖長によって分離することが可能である。また逆相カラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその疎水度によって分離し、糖鎖構造を確認することが可能である。HPLCの条件は以下の通りである。

1) アミドカラムによるサイズ分析

カラム：TSK-Gel Amido-80 (4.6 x 250 mm、東ソー製)

カラム温度：40度

流速：1 ml

溶出条件：A：200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 65%アセトニトリル

B：200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 30%アセトニトリル

0分 A=100% 50分 A=0%の直線濃度勾配

2) 逆相カラムによる構造解析

カラム：TSK-Gel ODS 80 TM (4.6 x 250 mm、東ソー製)

カラム温度：50度

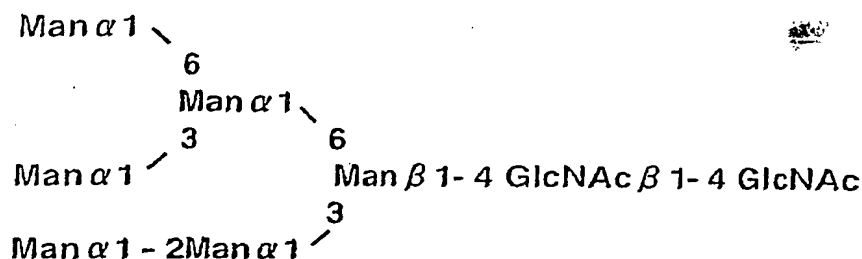
流速：1.2 ml

溶出条件：0.15% n-ブタノールを含む100 mM酢酸アンモニウム pH6.0

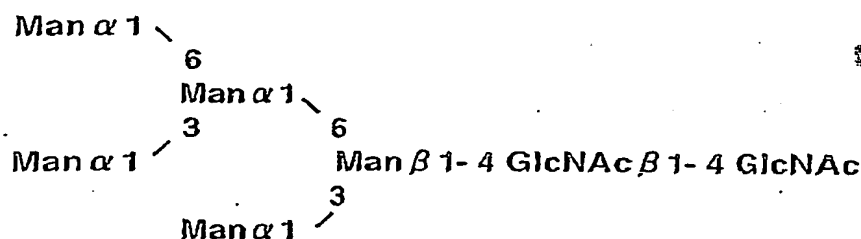
その結果を図13に示す。アミドカラムによるサイズ分析により、親株であるTK 1-3株については図13に示すようにMan5とともにMan6を生成したが、Δ OCH1株であるTK 3-A株はMan5を主に生成した。また逆相カラムによる構造解析を行い、市販のスタンダード糖鎖（宝酒造）と比較した結果、TK 1-3株のMan6は下記構造式1、Man5は下記構造式2の構造を有する糖鎖、一方TK 3-A株のMan5は下記構造式2

の構造を有する糖鎖であることが判った。

構造式1



構造式2



以上の結果より、取得した遺伝子は実質的に Ogataea minuta OCH1 遺伝子であること、該株において効果的に α -1,2-マンノシダーゼを発現させることにより Saccharomyces cerevisiae における och1、mnn1、mnn4 株に α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を発現させた株相当の糖鎖変異株の育種が可能であることが確認された。

〔実施例12〕 Ogataea minuta のプロテイナーゼA (PEP4) 遺伝子のクローニング
Ogataea minuta IF010746株よりプロテイナーゼA PEP4 遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(12-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank 登録番号 ; M13358)、Pichia angusta (GenBank登録番号 ; U67173)) 由来の PEP4 で保存されているアミノ酸配列
 TNYLNAQY (配列番号 47)
 KAYWEVKF (配列番号 48)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PPA5; 5' - ACNAAATAYYTNAAYGCNCARTA -3' (配列番号 49)

PPA3; 5' - AAYTTNACYTCCCTANGCYTT -3' (配列番号 50)

プライマーPPA5はアミノ酸配列TNYLNAQYに対応し、プライマーPPA3はアミノ酸配列KAYWEVKFに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPPA5、PPA3を用いて、PCR (94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae、Pichia angusta由来のPEP4遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.6kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(12-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(12-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例 (6-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約6kbのBamHI断片にPEP4遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、6kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIで切断したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約5000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた8個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMPA1を保持するクローンを選抜した。

(12-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMPA1 のNdeI-XbaI領域(図14)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号51に示す塩基配列が得られた。

配列番号51の塩基配列には、477番目から始まり、1709番目で終わる1233塩

基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号52）と *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia angusta*由来の *PEP4*との相同性を調べたところ、それぞれ67%、78%のアミノ酸が同一であった。

[実施例13] *Ogataea minuta*の*PEP4*遺伝子破壊株の作製

*Ogataea minuta*の*URA3*遺伝子をマーカーとした形質転換によって、*PEP4*遺伝子を破壊した。

(13-1) *PEP4*遺伝子破壊ベクターの作製

図14に示すように、*PEP4*構造遺伝子の約1.1kbのSmaI-XbaI領域を*URA3*遺伝子に置換したプラスミドpDOMPA1を作製した。*PEP4*遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持った*URA3*遺伝子をマーカーとして用いた。実施例(12-2)に記載の*PEP4*遺伝子領域を有するプラスミドpOMPA1をSacI切断、セルフライゲーション、ClaI切断、セルフライゲーションしたプラスミドを作成した。

得られたプラスミドをSmaIで切断し、HindIIIリンカーとライゲーション、XbaIで切断、平滑末端処理し、BglIIIリンカーとライゲーションした。

得られたプラスミドのBglIII-HindIII間に、実施例(8-1)に記載のpROMU1から単離した3.3kbのBglIII-HindIII断片と導入した。得られたプラスミドをpDOMPA1と命名した（図14）。

(13-2) 形質転換

実施例(13-1)で得られたpDOMPA1をSacI-ClaIで切断して、実施例(10-2)で得られた*Ogataea minuta* TK3-A株（och1Δura3Δ）、及び*Ogataea minuta* TK5-3株（och1Δura3Δade1Δ株）に電気パルス法で形質転換を行った。

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、*PEP4*遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPA1から単離した4.8kbのSacI-ClaI断片（図14）をプローブとしてサザン解析を行ったところ、宿主株では6kbにバンドが検出されるが、破壊株では9kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸（5-FOA）に耐性を示す株を取得

した。5-FOA耐性株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPA1から単離した4.8kbのSacI-ClaI断片（図14）をプローブとして再度サザン解析を行い、5.5kbの位置にバンドが検出されるURA3遺伝子が除去された株を選択した。得られたoch1 Δ pep4 Δ ura3 Δ 株をOgataea minuta TK6株、och1 Δ pep4 Δ ura3 Δ ade1 Δ 株をOgataea minuta TK7株と命名した。

〔実施例14〕 Ogataea minutaのPRB1遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりPRB1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(14-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号 ; M18097)、Kluyveromyces lactis (GenBank登録番号 ; A75534)由来のPRB1及びその遺伝子ホモログで保存されているアミノ酸配列

DG(L)NGHGTHCAG (配列番号 5 3)

GTSMAS(T)PHV(I)A(V)G (配列番号 5 4)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PPB5; 5' - GAYBKNAAYGGNCAYGGNACNCAYTGYKCNGG -3' (配列番号 5 5)

PPB3; 5' - CCNRCNAYRTGNGGNWSNGCCATNWSNGTNCC -3' (配列番号 5 6)

プライマーPPB5はアミノ酸配列DG(L)NGHGTHCAGに対応し、プライマーPPB 3はアミノ酸配列GTSMAS(T)PHV(I)A(V)Gに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPPB5、PPB3を用いて、PCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分）×25サイクル）を行った。増幅された約0.5kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にPichia pastoris及びKluyveromyces lactis由来のPRB1遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.5kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(14-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例

(14-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約5kbのBamHI断片にPRBI遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIで切断、BAP処理したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5 α 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた2個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMPBIを保持するクローンを選抜した。

(14-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMPBIのBamHI-HindIII領域(図15)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号57に示す塩基配列が得られた。

配列番号57の塩基配列には、394番目から始まり、2013番目で終わる1620塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号58)とPichia pastoris及びKluyveromyces lactis由来のPRBIとの相同性を調べたところ、それぞれ47%、55%のアミノ酸が同一であった。

[実施例15] Ogataea minutaのPRBI遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、PRBI遺伝子を破壊した。

(15-1) PRBI遺伝子破壊ベクターの作製

図15に示すように、PRBI構造遺伝子の約0.2kbのClaI-SphI領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMPB1を作製した。PRBI遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。実施例(14-2)に記載のPRBI遺伝子領域を有するプラスミドpOMPBIからBamHI断片を単離し、BamHIで切断し、BAP処理したpTV19 Δ Sph(SphIで切断し、平滑末端処理しセルフライゲーションし、SpHIサイトを除去したpTV19)

に導入した。

得られたプラスミドのClaI-SphI間に、実施例(8-1)に記載のpROMU1のBglIIサイトをClaIサイトに、HindIIIサイトをSphIサイトにそれぞれリンカーライゲーション法により変更したプラスミドから単離した3.3kbのClaI-SphI断片と導入した。得られたプラスミドをpDOMPB1と命名した(図15)。

(15-2) 形質転換

実施例(15-1)で得られたpDOMPB1をBamHIで切断して、実施例(13-2)で得られたOgataea minuta TK6株(och1 Δ pep4 Δ ura3 Δ)、及びOgataea minuta TK7株(och1 Δ pep4 Δ ura3 Δ ade1 Δ株)に電気パルス法で形質転換を行った。

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、PRB1遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPB1から単離した5kbのBamHI断片(図15)をプローブとしてサザン解析を行ったところ、宿主株では5kbにバンドが検出されるが、破壊株では8.5kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸(5-FOA)に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPB1から単離した5kbのBamHI断片(図15)をプローブとして再度サザン解析を行い、5kbの位置にバンドが検出されるURA3遺伝子が除去された株を選択した。得られたoch1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ株をOgataea minuta TK8株、och1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ株をOgataea minuta TK9株と命名した。

[実施例16] Ogataea minutaのKTR1遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりKTR1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(16-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae由来のKTR遺伝子ファミリーで保存されているアミノ酸配列(Biochim. Biophys. Acta, (1999) Vol. 1426, p326)を抽出し
H(N)YDWV(T)FLND(配列番号59)

YNLCHFWSNFEI(配列番号60)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PKR5; 5' - MAYTAYGAYTGGRYNTTYTNAAYGA -3' (配列番号 6 1)

PKR3; 5' - ATYTCRAARTTNSWCCARAARTGRCANARRTTRTA -3' (配列番号 6 2)

プライマーPKR5はアミノ酸配列H(N)YDWV(T)FLNDに対応し、プライマーPKR3はアミノ酸配列YNLCHFWSNFEIに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPKR5、PKR3を用いて、PCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル)を行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。60クロンの塩基配列の解析結果、計4種の遺伝子断片が確認され、これらは全て Saccharomyces cerevisiae 由来の KTR 遺伝子ファミリーのアミノ酸配列と高い相同性を有していた。このうち1クローンについて、0.6kbの挿入断片についてプラスミドをEcoRIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した。

(16-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(12-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約2kbのSacI断片に KTR1 遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをSacIで切断し、アガロース電気泳動後、2kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をSacIで切断しBAP処理したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約4000クロンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた2個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMKR1を保持するクローンを選抜した。

(16-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMKR1のSacI挿入断片(図16)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号63に示す塩基配列が得られた。

配列番号63の塩基配列には、124番目から始まり、1335番目で終わる1212塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディ

ングフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号64）と *Saccharomyces cerevisiae* 由来の *KTR* 遺伝子ファミリーである *KTR1*、*KRE2* との相同性を調べたところ、それぞれ53%、49%のアミノ酸が同一であった。

〔実施例17〕 *Ogataea minuta* の *KTR1* 遺伝子破壊株の作製

Ogataea minuta の *URA3* 遺伝子をマーカーとした形質転換によって、*KTR1* 遺伝子を破壊した。

(17-1) *KTR1* 遺伝子破壊ベクターの作製

図16に示すように、*KTR1* 構造遺伝子の0.3kbのEcoRI-BglII領域を *URA3* 遺伝子に置換したプラスミドpDOMKR1を作製した。*KTR1* 遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持った *URA3* 遺伝子をマーカーとして用いた。実施例(16-2)に記載の *KTR1* 遺伝子領域を有するプラスミドpOMKR1をHindIII-XbaIで切断、平滑末端処理し、ライゲーションした。得られたプラスミドをEcoRIで切断し、HindIIIリンカーとライゲーションした。

得られたプラスミドのBglIII-HindIII間に、実施例(8-1)に記載のpROMU1から単離した3.3kbのBglIII-HindIII断片と導入した。得られたプラスミドをpDOMKR1と命名した（図16）。

(17-2) 形質転換

実施例(17-1)で得られたpDOMKR1をSacI-ClaIで切断して、実施例(15-2)で得られた *Ogataea minuta* TK8株（och1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ）、及び *Ogataea minuta* TK9株（och1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ 株）に電気パルス法で形質転換を行った。

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、*KTR1* 遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをSacIで切断し、pOMKR1から単離した2kbのSacI断片（図16）をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、宿主株では2kbにバンドが検出されるが、破壊株では5kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸（5-FOA）に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAをSacIで切断し、pOMKR1から単離した2kbのSacI断片（図16）をプローブとして再度サザン解析を行い、2kbの位置にバンドが検出さ

れる URA3 遺伝子が除去された株を選択した。得られた och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ 株を Ogataea minuta TK10株、och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ 株を Ogataea minuta TK11株と命名した。

Ogataea minuta TK-10株、及び Ogataea minuta TK-11株のハイグロマイシンBに対する感受性を調べた。野生株である Ogataea minuta IF010746株では50 μg/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでコロニーが出現するが、Ogataea minuta TK-10株、Ogataea minuta TK-11株では5 μg/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでもコロニーが全く出現しなかった。Saccharomyces cerevisiae の糖鎖変異株では、ハイグロマイシンB等の薬剤に対する感受性が野生株と比較して上昇することが知られている。よってこれらの Ogataea minuta ktr1 Δ 株も糖鎖が短くなっていることが推察された。

またこれらの Ogataea minuta ktr1 Δ 株は Saccharomyces cerevisiae och1 Δ 株と同様に、細胞の沈降性が著しく上昇しており、糖鎖が短くなっていることが推察された。

〔実施例18〕 Ogataea minuta の MNN9 遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株より MNN9 遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(18-1) プロープの作成 Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号 ; L23752)、Candida albicans (GenBank登録番号 ; U63642) 由来の MNN9 で保存されているアミノ酸配列

TSWVLWLDAD (配列番号 6 5)

ETEGFAKMAK (配列番号 6 6)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PMN5; 5' - ACNWSNTGGGTNYTNTGGYTNGAYGCNGA -3' (配列番号 6 7)

PMN3; 5' - TTNGCCATYTTNGCRAANCCYTCNGTYTC -3' (配列番号 6 8)

プライマーPMN5はアミノ酸配列TSWVLWLDADに対応し、プライマーPMN3はアミノ酸配列ETEGFAKMAKに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPMN5、PMN3を用いて、PCR ((94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。

増幅された約0.4kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びCandida albicans由来のMNN9遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.4kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(18-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(18-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約8kbのBamHI断片にMNN9遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、8kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIで切断したpUC118とライゲーションした後、大腸菌DH5 α 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた2個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMMN9-1を保持するクローンを選抜した。

(18-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMMN9-1のApaI-BglIII領域(図17)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号69に示す塩基配列が得られた。配列番号69の塩基配列には、931番目から始まり、2034番目で終わる1104塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号70)とSaccharomyces cerevisiae及びCandida albicans由来のMNN9遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ59%、62%のアミノ酸が同一であった。

[実施例19] Ogataea minutaのMNN9遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、MNN9遺伝子を破壊した。

(19-1) MNN9遺伝子破壊ベクターの作製

図17に示すように、MNN9構造遺伝子の約1kbのSal-BglIII領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMN9を作製した。MNN9遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。実施例18に記載のMNN9遺伝子領域を有するプラスミドpOMMN9-1から単離した1.2kbのApaI-SalI断片をpBluescript II SK-のApaI-SalI間に導入した。得られたプラスミドのXbaI-HindIII間にpOMMN9-1から単離した2.2kbのNheI-BglIII断片と実施例(8-1)に記載のpROMU1から単離した3.3kbのBglIII-HindIII断片とを導入した。得られたプラスミドをpDOMN9と命名した(図17)。

(19-2) 形質転換

実施例(19-1)で得られたpDOMN9をApaIで切断して、実施例(15-2)で得られたOgataea minuta TK8株(och1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ)、Ogataea minuta TK9株(och1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ adel Δ 株)、及び実施例(17-2)で得られたOgataea minuta TK10株(och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ)、Ogataea minuta TK11株(och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ adel Δ 株)に電気パルス法で形質転換を行った。

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、MNN9遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをApaIとBglIIIで切断し、pOMMN9-1から単離した1.2kbのApaI-SalI断片(図17)をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、宿主株では2.2kbにバンドが検出されるが、破壊株では5.5kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸(5-FOA)に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーDMN5; 5'-AGATGAGGTGATTCCACGTAATTTGCCAGC-3'(配列番号71)、及びDMN3; 5'-TTTTGATTGTCATCTATTTTCGCACACCCTG-3'(配列番号72)を用いたPCR(94°Cで30秒、60°Cで1分、72°Cで1分)×25サイクルを行った。その結果、URA3遺伝子が欠落した株から、1kbの増幅DNA断片が検出された。得られたoch1 Δ mnn9 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ 株をOgataea minuta TK12株、och1 Δ mnn9 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ adel Δ 株をOgataea minuta TK13株、och1 Δ ktr1 Δ mnn9 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ 株

をOgataea minuta TK14株、及びoch1 Δ ktr1 Δ mnn9 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ adel Δ 株をOgataea minuta TK15株と命名した。

Ogataea minuta TK14株、及びOgataea minuta TK15株のハイグロマイシンBに対する感受性を調べた。野生株であるOgataea minuta IF010746株では実施例(17-2)に記載したように50 μ g/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでコロニーが出現するが、Ogataea minuta TK12株、及びOgataea minuta TK13株では20 μ g/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでもコロニーが全く出現しなかった。よってこれらのOgataea minuta mnn9 Δ 株についても糖鎖が短くなっていることが推察された。

〔実施例20〕 Ogataea minutaのアルコールオキシダーゼ (*AOXI*) 遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株より*AOXI*遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(20-1) プローブの作成

Pichia pastoris (GenBank 登録番号 ; U96967、U96968) 及び Candida boidinii (GenBank登録番号 ; Q00922) 由来のアルコールオキシダーゼで保存されているアミノ酸配列

GGGSSINFMMYT (配列番号 7 3)

DMWPMVWAYK (配列番号 7 4)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PAX5; 5' - GGNGGNGGNWSNWSNATHAAYTTYATGATGTAYAC -3' (配列番号 7 5)

PAX3; 5' - TTRTANGCCCANACCATNGGCCACATRTC -3' (配列番号 7 6)

プライマーPAX5はアミノ酸配列GGGSSINFMMYTに対応し、プライマーPAX3はアミノ酸配列DMWPMVWAYKに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPAX5、PAX3を用いて、PCR (94°Cで30秒、50°Cで1分、72°Cで1分) \times 25サイクル) を行った。増幅された約1.1kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にPichia pastoris及びCandida boidinii由来のアルコ

ールオキシダーゼ遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。1.1kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(20-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(20-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約6kbのHindIII断片にAOX1遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIで切断し、アガロース電気泳動後、6kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIで切断したpUC118とライゲーションした後、大腸菌DH5 α 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた6個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMAX1を保持するクローンを選抜した。

(20-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMAX1のHindIII-SmaI領域(図18)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号77に示す塩基配列が得られた。

配列番号77の塩基配列には、2349番目から始まり、4340番目で終わる1992塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号78)とPichia pastoris及びCandida boidinii由来のアルコールオキシダーゼとの相同性を調べたところ、それぞれ72%、74%のアミノ酸が同一であった。

〔実施例21〕 AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った異種遺伝子発現プラスミドの構築

(21-1) AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った発現カセットの構築

Ogataea minutaのAOX1遺伝子プロモーター(配列番号79)とターミネーター

(配列番号 80) との間に、外来遺伝子を導入する発現カセットを作製した。
AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとの間にXbaI、SmaI、BamHI部位を導入するために、以下のプライマーを合成した。

OAP5 ; 5' - CTGCAGCCCCTTCTGTTTTTCTTTTGACGG -3' (配列番号 81)

OAP3 ; 5' - CCCCCGGATCCAGGAACCCGGAACAGAATCTAGATTTTTTCGTAAGTCGTAAGTCGTAACAGAACACAAGAGTCTTTGAACAAGTTGAG-3' (配列番号 82)

OAT5 ; 5' -CCCCCCCCGGATCCGAGACGGTGCCCGACTCTTGTTCATTCTTTTGG-3' (配列番号 83)

OAT3 ; 5' -CCCATAATGGTACCGTTAGTGGTACGGGCAGTC-3' (配列番号 84)

図18に示すpOMAX1を鋳型とし、プライマーOAP5とOAP3を用いたPCR (94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル)、プライマーOAT5とOAT3を用いたPCR (94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル) を行った。それぞれの増幅された0.5kb、0.8kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するクローンを選抜した。0.5kb、0.8kbの挿入DNA断片はそれぞれ、PstI-BamHII断片及びBamHI-KpnI断片として単離した。pOMAX1のPstI-BamHII間に前述の0.5kbのPstI-BamHII断片を導入した。その後得られたプラスミドのBamHI-KpnI間に0.8kbのBamHI-KpnI断片を導入した。得られたプラスミドをpOMAXPT1と命名した (図18)。

pOMAXPT1はXbaI、SmaI、BamHI部位に外来遺伝子を導入し得るAOX1遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを有している。

(21-2) URA3遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例(5-2)に記載のpOMUR1より単離したOgataea minuta URA3遺伝子を含む3.1kbのBglIII-HindIII断片をpUC19のBamHI-HindIII間に導入した。得られたプラスミドをpOMUR5と命名した (図18)。pOMUR5をStyIとSacI切断、平滑末端処理後、ApaIリンカーを導入した。得られたプラスミドをpOMUR6と命名した。pOMUR6をXbaI切断、平滑末端処理後、ライゲーションさせた。得られたプラスミドを

pOMUR-Xと命名した。pOMUR-XをSalI切断、平滑末端処理後、NotIリンカーを導入した。

得られたプラスミドをpOMUR-XNと命名した。実施例(21-1)記載のpOMAXPT1より単離したOgataea minuta AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる発現カセットを含む3.1kbのHindIII-KpnI断片をpOMUR-XNのHindIII-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex1Uと命名した(図18)。

またpOMex1UをBglII切断、平滑末端処理後、NotIリンカーを導入した。得られたプラスミドをpOMex1U-N0と命名した(図18)。pOMex1U-N0より単離したOgataea minuta AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる発現カセットを含む3.1kbのHindIII-KpnI断片をpOMUR-XのHindIII-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex2Uと命名した(図18)。

(21-3) G418耐性遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例4に記載のGAP遺伝子プロモーターとターミネーターによるG418耐性遺伝子発現カセットを有するpOMKmR1をPstI切断、平滑末端処理後、ApaIリンカーを導入した。得られたプラスミドよりG418耐性遺伝子発現カセットを2.3kbのApaI-KpnI断片として単離し、実施例(21-2)に記載のpOMex1U-N0のApaI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex3Gと命名した(図18)。

(21-4) ADE1遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例7に記載のADE1遺伝子を含むpOMAD1をSmaI切断後、ApaIリンカーを導入、EcoRV切断後、KpnIリンカーを導入、更にBglII切断、平滑末端処理後、NotIリンカーを導入したプラスミドを作成した。得られたプラスミドよりADE1遺伝子発現カセットを3.1kbのApaI-KpnI断片として単離し、pOMex1UをApaI-KpnIして得られたOgataea minuta AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる発現カセットを含むApaI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex4Aと命名した(図18)。

(21-5) ハイグロマイシンB耐性遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

抗生物質ハイグロマイシンB耐性選抜による形質転換を行うためにハイグロマイシンB耐性遺伝子（ハイグロマイシンBフォスフトランスフェラーゼ遺伝子）の発現カセットを含むプラスミドを構築した。

ハイグロマイシンB耐性遺伝子を単離するため、以下のプライマーを合成した。
HGP5 ; 5' - GTCGACATGAAAAAGCCTGAACTCACCGC -3' (配列番号 8 5)
HGP3 ; 5' - ACTAGTCTATTCTTTGCCCTCGGACG -3' (配列番号 8 6)

ハイグロマイシンB耐性遺伝子を含むプラスミドpGARH (Applied Environ. Microbiol., Vol. 64 (1998) p2676) を鋳型とし、プライマーHGP5とHGP3を用いたPCR ((94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル) を行った。増幅された1.0kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。

挿入DNA断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するクローンを選抜した。1.0kbの挿入DNA断片は、SalI-EcoT22II断片として単離し、実施例3で構築したpOMGP4のSalI-EcoT22II間に導入した。得られたプラスミドをpOMHGR1と命名した。得られたプラスミドをHindIII切断、平滑末端処理後、ApaIリンカーを導入した。得られたプラスミドよりハイグロマイシンB耐性遺伝子発現カセットを3.0kbのApaI-KpnI断片として単離し、実施例(21-2)に記載のpOMex1U-N0のApaI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex5Hと命名した (図18)。

〔実施例22〕 URA3遺伝子を選択マーカーとしたGAP遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例3に記載のpOMGP4よりGAP遺伝子プロモーターとターミネーターによる遺伝子発現カセットを2.0kbのHindIII-KpnIとして単離し、実施例(21-2)に記載のpOMUR-XN、及び実施例(21-4)に記載のpOMex4AのHindIII-KpnI間 (pOMex4AはpUC19-ADE1を含む断片) に導入した。得られたプラスミドをそれぞれpOMexGP1U、及びpOMexGP4Aと命名した (図18)。

〔実施例23〕 AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによるAspergillus saitoi 由来α-1,2-マンノシダーゼ発現プラスミドの構築

実施例11のようにOgataea minuta Δoch1株に、α-1,2-マンノシダーゼを発現させることにより、Man5生産酵母の育種が可能であることが示唆された。そこで、

α -1,2-マンノシダーゼを発現する *Ogataea minuta* $\Delta och1$ 株の作成を実施した。発現させる酵素遺伝子として、アスペルギノペプシンI (apnS) のシグナル配列をアミノ末端に有し、酵母小胞体 (ER) 滞留シグナル (HDEL) をカルボキシ末端に有する *Aspergillus saitoi* 由来 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子 (J. Biol. Chem., 273 (1998) 26298) を用いた。該遺伝子を含むプラスミド pGAMH1 を鋳型とし、プライマー ; 5'-GGGGGGTCGACATGGTGGTCTTCAGCAAAACCGCTGCCC-3' (配列番号 87)、及び 5'-GGGGGGCGGCCGCGTGATGTTGAGGTTGTTGTACGGAACCCCC-3 (配列番号 88) を用いて、PCR (94°C で 30 秒、50°C で 1 分、72°C で 30 秒) \times 20 サイクル) を行った。増幅された α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子の 5' 上流領域の約 0.5kb の DNA 断片を回収し、SalI と NotI で切断した後、pBluescript II SK- の SalI-NotI 間に導入した。挿入 DNA 断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するクローンを選抜した。得られたプラスミドの BglIII-NotI 間に、pGAMH1 より単離した α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子内 BglIII 部位下流領域の 1.2kb の BglIII-NotI 断片を導入した。このプラスミドを paMSN と命名した。paMSN を SalI 切断、平滑末端処理後、XbaI リンカーを導入した。このプラスミドを paMXN と命名した。また一方で paMSN を NotI 切断、平滑末端処理後、BamHI リンカーを導入した。このプラスミドを paMSB と命名した。paMXN を XbaI-ApaI 消化し α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子上流領域を含む 0.4kb の XbaI-BglIII 断片を、また paMSB を ApaI-BamHI 消化し α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子下流領域を含む 1.1kb の ApaI-BamHI 断片を単離し、実施例 (21-2) 記載の pOMex1U、及び実施例 (21-3) 記載の pOMex3G の XbaI-BamHI 間に 3 点ライゲーションにより導入した。得られたプラスミドをそれぞれ pOMaM1U、pOMaM3G と命名した。

〔実施例 24〕 *Aspergillus saitoi* 由来 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子発現 *Ogataea minuta* $\Delta och1$ 株の作成と糖鎖分析

実施例 23 で得られた pOMaM1U を NotI で切断し、実施例 (10-2) で得られた *Ogataea minuta* TK 3-A 株 ($och1 \Delta ura3 \Delta$) を形質転換した。得られた形質転換体の菌体内 α -1,2-マンノシダーゼ活性を測定した。BYPM 培地 (0.67% 酵母ニトロゲンベース、1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、100mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0、0.5% メタノール) で培養した形質転換体を集菌し、1% TritonX100、1mM PMSF の入っ

た0.1M酢酸ナトリウム pH5.0バッファーに懸濁後、ガラスビーズで菌体を破碎し、細胞抽出液を得た。これを適宜希釈し、20 pmol量のMan6b糖鎖（宝酒造製）を加え、37度で10分から60分反応させた。反応後煮沸し酵素を失活させた後、HPLCにて生成したMan5糖鎖を分析した。条件は以下の通り。

カラム：TSK-Gel ODS 80TM (6×150mm、東ソー)

カラム温度：50度

流速：1.2 ml

溶出条件：A：100mM酢酸アンモニウム pH6.0

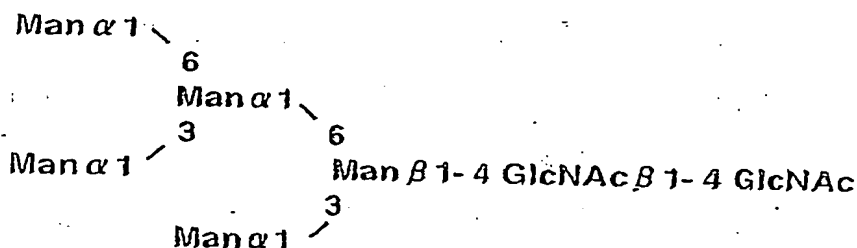
B：100mM酢酸アンモニウム pH6.0+0.15%ブタノール

0分 A=70%、12分A=0%の直線濃度勾配

最も α -1,2-マンノシダーゼ活性の高かった酵母株を選抜し、該酵母を*Ogataea minuta* TK3-A-MU1株と命名した。該菌株を再度BYPM培地で培養し、細胞表層マンナン蛋白質の糖鎖構造解析を行った。PA化オリゴ糖を調製は実施例1に記載の方法にて行い。HPLCによる分析は実施例11に記載の方法にて行った。

その結果を図19に示す。順相カラムによるサイズ分析により、*Ogataea minuta* TK3-A-MU1株はMan5GlcNAc2を主に生成した。また逆相カラムによる構造解析からこのMan5GlcNAc2は下記構造式2の糖鎖を生成しており、これらは混成型・複合型の前駆体であるヒト型のハイマンノース型糖鎖と一致した。

構造式2



〔実施例25〕 *AOX1*遺伝子プロモーターとターミネーターによる*Saccharomyces cerevisiae*由来インベルターゼ発現プラスミドの構築

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号；V01311) のインベルターゼ

(SUC2) 遺伝子をPCRによって取得した。Saccharomyces cerevisiae S288C株の染色体DNAを鋳型とし、プライマー；5'-GGGACTAGTATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTG-3'（配列番号89）、及び5'-CCCCAGATCTTATTTTACTTCCCTTACTTGGAAGTTGTC-3'（配列番号90）を用いて、PCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1.5分）×20サイクル）を行った。増幅された約1.4kbのDNA断片を回収し、SpeIとBglIIで切断した後、実施例(21-2)記載のpOMex1U、及び実施例(21-3)記載のpOMex3GのXbaI-BamHI間に導入した。得られたプラスミドをそれぞれpOMIV1U、pOMIV3Gと命名した。

〔実施例26〕 Aspergillus saitoi 由来 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子発現 Ogataea minuta OCHI遺伝子破壊株へのSaccharomyces cerevisiae由来インベルターゼ遺伝子の導入、及び発現

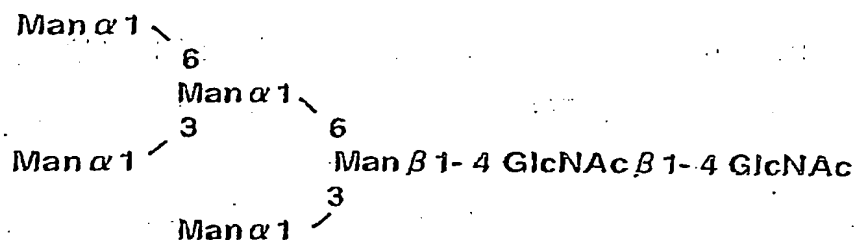
実施例25で得られたpOMIV3GをNotIで切断後、実施例24に記載のOgataea minuta TK3-A-MU1株に導入した。形質転換株をBYPM培地（0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ポリペプトン、100mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0、0.5%メタノール）で培養し、遠心分離によって得られた培養上清について以下の方法でインベルターゼ活性を測定した。すなわち適宜希釈した2 μ lの培養上清と、200 μ lの2%ショ糖を含む100mM 酢酸ナトリウムバッファー（pH 5.0）を混合した後、37℃で10～30分間インキュベートし、反応液2 μ lを500 μ lのグルコーステスト・ワコー（和光純薬）を加え発色させた。インベルターゼによって遊離したグルコースにより発色する吸光度（505nm）を測定した。最も生産性の高かった酵母株Ogataea minuta TK3-A-MU-IVG1株では約600mg/l培地中にインベルターゼが生産され、培養上清に含まれる蛋白質の大部分を占めていた。

〔実施例27〕 実施例26で作成された株が分泌生産するSaccharomyces cerevisiae由来インベルターゼの糖鎖構造解析

実施例26で得られたOgataea minuta TK3-A-MU-IVG1株の培養上清をアミコンYM76限外ろ過膜で濃縮、脱塩処理後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（Q-セファロースFF、アマシャムファルマシアバイオテク）に供し、インベルターゼ画分を精製した。この画分を凍結乾燥し実施例1に記載の方法にてPA化N結合型糖鎖を調製した。HPLCによる分析は実施例11に記載の方法にて行った。

その結果を図20に示す。アミドカラムによるサイズ分析の結果から、インベルターゼの糖鎖は90%以上Man5GlcNAc2から構成されていることが示された。また逆相カラムによる構造解析からこのMan5GlcNAc2は実施例24に記載の構造式2の糖鎖を生成しており、これらは混成型・複合型の前駆体であるMan5型のハイマンノース型糖鎖と一致した。

構造式2



〔実施例28〕 ヒト抗体遺伝子が導入されたOgataea minuta OCH1遺伝子破壊株の育種、該株へのAspergillus saitoi 由来 α -1,2マンノシダーゼ遺伝子の導入・発現、及び当該株を用いたヒト抗体の生産

実施例(15-2)で得られたOgataea minuta TK9株 (och1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ adel Δ) に抗ヒトG-CSF抗体遺伝子を導入した。

まず抗ヒトG-CSF抗体産生ハイブリドーマの作成は、まずヒトG-CSFを抗原として富塚らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97(2), 722-7(2000)) により、抗ヒトG-CSF抗体産生マウスを作成し、常法 (村松ら編、実験生物学講座、第14巻、p348~364) に従い、脾臓を取り出し、B細胞とマウスミエローマを細胞融合しハイブリドーマを得た。ハイブリドーマからの抗体遺伝子の取得は、Welschof, Mらの方法 (J. Immunol. Methods. 179(2), 203-14 (1995)) により行った。

以上の方法により得られた抗G-CSF糖鎖遺伝子 (配列番号91、コードされるアミノ酸配列を配列番号92に示す)、及び重鎖遺伝子 (配列番号93、コードされるアミノ酸配列を配列番号94に示す) のN末端側にXbaIリンカーを、またC末端側にBamHIリンカーを付加し、糖鎖遺伝子を実施例(21-4)に記載のpOMex4A

のXbaI-BamHIサイトへ、重鎖遺伝子を実施例(21-3)に記載のpOMex3GのXbaI-BamHIサイトへそれぞれ導入した。それぞれに作成された発現ベクターをNotI消化後、Ogataea minuta TK9株を順次形質転換した。得られた形質転換体をBYPMG培地(0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ポリペプトン、100mMリン酸カリウム緩衝液 pH6.0、1%メタノール、0.2%グリセロール)で20℃、72時間培養し、遠心分離によって得られた培養上清を用いて、西洋ワサビパーオキシダーゼでラベルされた抗ヒトIgGヒツジ抗体(アマシャムファルマシアバイオテック)を用いてウエスタン解析を行った。まず培養上清100 μ lをマイクロコン YM30にて濃縮し、SDS-PAGEに供した。次に泳動された蛋白をPVDF膜(イモビロン、ミリポア)にブロッティングし、膜を(ブロックエース、大日本製薬)を用いて1時間ブロッキングした。西洋ワサビパーオキシダーゼでラベルされた抗ヒトIgGヒツジ抗体(1000倍希釈)を含有するTBS(0.15Mの食塩の入ったトリス緩衝液)溶液中に1時間インキュベートし、結合しなかった抗体を0.04%ツイーン20を含有するTBSにて洗浄した。シグナルの検出は(スーパーシグナル・ウエストデュラ、ピラス)を用いて行った。その結果、培養上清中に抗体を産生している形質転換体を選択し、Ogataea minuta TK9株由来の抗体生産株を Ogataea minuta TK9-IgB1株と命名した。

次にOgataea minuta TK9-IgB1株にAspergillus saitoi由来 α -1,2マンノシダーゼ遺伝子を導入した。実施例23で作成したプラスミドpOMaM1Uを用いて、実施例24に記載の方法にて、形質転換後、得られた形質転換体より α -1,2マンノシダーゼ発現株の選抜を行った。その結果、得られた株をOgataea minuta TK9-IgB-aM株と命名した。Ogataea minuta TK9-IgB-aM株をBYPMG培地で20℃、72時間培養し、遠心分離によって得られた培養上清を用いてウエスタン解析を行った。

その結果を図21に示すが、Ogataea minuta TK9-IgB-aM株は、抗体重鎖は一部分解しているものが検出されたが、抗体軽鎖及び重鎖を生産していた。

更にOgataea minuta TK9-IgB-aM株の培養上清をアミコンYM76限外ろ過膜で濃縮、脱塩処理後、ProteinAカラムクロマトグラフィー(Hi-Trap ProteinA HP、アマシャムファルマシアバイオテック)に供し、グリシン-塩酸pH3.0にて溶出することにより抗体画分を精製した(図22)。この抗体が抗原であるG-CSFと結合

することを検出するためウエスタン解析を行った。方法は1次抗体として精製された抗体を、2次抗体として西洋ワサビパーオキシダーゼでラベルされた抗ヒトIgGヒツジ抗体を用い、その他は上記に準じて行った。その結果を図23に示すが、Ogataea minuta TK9-IgB1株が産生した抗体が抗原であるG-CSFと結合することが示された。

〔実施例29〕 実施例28で作成された株が生産するヒト抗体の糖鎖構造解析

実施例28で示したOgataea minuta TK9-IgB-aM株を用いて生産・精製された抗体、及び同様の方法でOgataea minuta TK9-IgB株より得た抗体を透析後、凍結乾燥し、実施例11に記載の方法に準じてPA化N結合型糖鎖を調製、順相カラムによるサイズ分析を行った。その結果を図24に示すが、Ogataea minuta TK9-IgB株の生産する抗体の糖鎖は $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ が主成分であったが、Ogataea minuta TK9-IgB-aM株の生産する抗体の糖鎖は主に $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ であり、哺乳類型のハイマンノース型糖鎖を有することが示された。また、このとき糖鎖の80%以上が $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ から構成されていることが示された。

〔実施例30〕 *Ogataea minuta*のHIS3（イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼ）遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりHIS3遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(30-1) プロブの作成

Saccharomyces cerevisiae（登録番号；CAA27003）及びPichia pastoris（Q92447）由来のHIS3遺伝子産物で保存されているアミノ酸配列VGFLDHM（配列番号95）

PSTKGVL（配列番号96）

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PHI5；5'-TNGGNTTYTNGAYCAYATG-3'（配列番号97）

PHI3；5'-ARNACNCCYTTNGTNSWNGG-3'（配列番号98）

プライマーPHI5はアミノ酸配列VGFLDHMに対応し、プライマーPHI3はアミノ酸配列PSTKGVLに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPHI5、PHI3を

用いて、PCR（（94℃で30秒、50℃で30秒、72℃で1分）×25サイクル）を行った。増幅された約0.5kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のHIS3遺伝子産物のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.5kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

（30-2）ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例（30-1）で得られたDNA断片をプローブとして実施例（2-2）に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約4kbのPstI断片にHIS3遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをPstIで切断し、アガロース電気泳動後、4kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をPstIで切断しBAP処理したpUC118とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約2000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた4個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMHI1を保持するクローンを選抜した。

（30-3）塩基配列決定

プラスミドpOMHI1のPstI-PstI領域（図25）の塩基配列を、プライマーウォーキング法により決定し、配列番号99に示す塩基配列が得られた。

配列番号99の塩基配列には、1839番目から始まり、2552番目で終わる714塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号100）とSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のHIS3遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ73%、71%のアミノ酸が同一であった。

〔実施例31〕 Ogataea minutaのHIS3遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、HIS3遺伝子

を破壊した。

(31-1) HIS3遺伝子破壊ベクターの作製

図 2 5 に示すように、HIS3構造遺伝子の約70bp領域をURA3遺伝子に置換したプラスミド pDOMHI1 を作成した。

実施例 (8-1) に記載の pROMU1 を BglII で切断、平滑末端処理、EcoT22I リンカーとライゲーションした。得られたプラスミドを pROMUHT と命名した。

実施例 (30-3) に記載の HIS3 遺伝子領域を有するプラスミド pOMHI1 を PflMI で切断、平滑末端処理、EcoT22I リンカーとライゲーションした。得られたプラスミドを pOMHI2 と命名した。pOMHI2 を EcoRI と SalI で切断し、EcoRI および SalI で切断した pBluescript II KS+ とライゲーションした。得られたプラスミドを pOMHI3 と命名した。pOMHI3 を BtgI で切断し、平滑末端処理し HindIII リンカーとライゲーションをした。得られたプラスミドを pOMHI4 と命名した。得られたプラスミドの EcoT22I-HindIII 間に pROMUHT から単離した 3.3kb の EcoT22I-HindIII 断片を導入した。得られたプラスミドを pDOMHI1 と命名した (図 2 5)。

(31-2) 形質転換

実施例 (30-2) で得られた pDOMHI1 を BamHI と XhoI で切断して、実施例 (17-2) で得られた Ogataea minuta TK11 株 (*och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ*) に電気パルス法で形質転換を行った。これらの株の HIS3 遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した (それぞれのプライマーの位置は図 2 6 参照)

DHI5; 5' - GGCCCAATAGTAGATATCCC -3' (配列番号 1 0 1)

DHI3; 5' - CACGGCCCGTGTAGCTCGTGG -3' (配列番号 1 0 2)

形質転換株から単離した染色体 DNA を鋳型とし、プライマー DHI5、DHI3 を用いて、PCR ((94℃ で 30 秒、60℃ で 1 分、72℃ で 2 分) × 25 サイクル) を行った。図 2 6 に示すように、プラスミドが HIS3 座に組み込まれた株からは、4.6kb の増幅 DNA 断片が検出された。選抜した株を YPD 培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸 (5-FOA) に耐性を示す株を取得した。5-FOA 耐性株の染色体 DNA を鋳型とし、プライマー DHI5、DHI3 を用いた PCR ((94℃ で 30 秒、60℃ で 1 分、72℃ で 3 分) × 25 サイクル) を行った。図 2 6 に示すように、URA3 遺伝子が欠落

した株から、2kbの増幅DNA断片が検出された。このoch1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ adel Δ his3 Δ をOgataea minuta YK1株と命名した。

〔実施例 3 2〕 HIS3遺伝子を選択マーカーとしたAOXI遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例 (30-3) に記載の HIS3 遺伝子を含む pOMH11 を SacI 切断し平滑末端処理後、ApaI リンカーを導入、NcoI 切断し平滑末端処理後、KpnI リンカーを導入、さらに EcoRI 切断し平滑末端処理後、NotI リンカーを導入したプラスミドを作成した。得られたプラスミドより HIS3 遺伝子発現カセットを 2.6kb の ApaI-KpnI 断片として単離し、pOMex1U の ApaI-KpnI 間に挿入した。得られたプラスミドを pOMex6HS とした (図 3 2)。

実施例 2 5 で得られた Saccharomyces cerevisiae 由来インベルターゼ遺伝子を含む約 1.4kb の SpeI-BglIII 断片を pOMex6HS の XbaI-BamHI 間に導入し、pOMIV 6 HS を作成した。pOMIV 6 HS を NotI で切断後、実施例 (31-2) に記載の Ogataea minuta YK1 株に導入した。形質転換株を BYPM 培地 (0.67% 酵母ニトロゲンベース、1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、100mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0、0.5% メタノール) で培養し、遠心分離によって得られた培養上清について以下の方法でインベルターゼ活性を測定した。すなわち適宜希釈した 2 μ l の培養上清と、200 μ l の 2% ショ糖を含む 100mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.0) を混合した後、37°C で 10~30 分間インキュベートし、反応液 2 μ l を 500 μ l のグルコーステスト・ワコー (和光純薬) を加え発色させた。インベルターゼによって遊離したグルコースにより発色する吸光度 (505nm) を測定した。酵母株 Ogataea minuta YK1-IVH1 株では培地中に著量のインベルターゼが生産されていた。

〔実施例 3 3〕 Ogataea minuta の LEU2 (3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素) 遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746 株より LEU2 遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(33-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (登録番号 ; CAA27459) 及び Pichia angusta (P34733) 由来の LEU2 遺伝子産物で保存されているアミノ酸配列

AVGGPKWG (配列番号 1 0 3)

AAMMLKL (配列番号 1 0 4)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PLE5; 5' - GCNGTNGGNGGNCCNAARTGGGG -3' (配列番号 1 0 5)

PLE3; 5' - NARYTTNARCATCATNGCNGC-3' (配列番号 1 0 6)

プライマーPLE5はアミノ酸配列AVGGPKWGに対応し、プライマーPLE3はアミノ酸配列AAMMLKLに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPLE5、PLE3を用いて、PCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.7kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びPichia angusta由来のLEU2遺伝子産物のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.7kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(33-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(33-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約6kbのBamHI-ClaI断片にLEU2遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをBamHIとClaIで切断し、アガロース電気泳動後、6kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIとClaIで切断したpBluescript II KS+とライゲーションした後、大腸菌DH5 α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約3000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた7個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMYP1を保持するクローンを選抜した。

(33-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMLE1のBamHI-ClaI領域(図28)の塩基配列をプライマーウォーキ

ング法により決定し、配列番号107に示す塩基配列が得られた。

配列番号107の塩基配列には、1606番目から始まり、2694番目で終わる1089塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号108）と *Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia angusta* 由来の *LEU2* 遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ80%、85%のアミノ酸が同一であった。

〔実施例34〕 *Ogataea minuta* の *LEU2* 遺伝子破壊株の作製

Ogataea minuta の *URA3* 遺伝子をマーカーとした形質転換によって、*LEU2* 遺伝子を破壊した。

(34-1) *LEU2* 遺伝子破壊ベクターの作製

図28に示すように、*LEU2* 構造遺伝子の約540b領域を *URA3* 遺伝子に置換したプラスミド pDOMLE1 を作製した。*LEU2* 遺伝子破壊株より再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持った *URA3* 遺伝子をマーカーとして用いた。実施例(31-1)に記載の pROMUHT を HindIII で切断し平滑末端処理後 NheI リンカーとライゲーションをした。得られたプラスミドを pROMUNT と命名した。

pOMLE1 を StuI で切断し平滑末端処理後、NheI リンカーを挿入した。得られたプラスミドを pOMLE2 と命名した。pOMLE2 の NheI-PstI 間に pOMURNT から単離した 3.3kb の Nhe-EcoT22I 断片を挿入した。得られたプラスミドを pDOMLE1 と命名した。

(34-2) 形質転換

実施例(34-1)で得られた pDOMLE1 を BamHI と ClaI で切断して、実施例(17-2)で得られた *Ogataea minuta* TK11 株 (*och1* Δ *ktr1* Δ *pep4* Δ *prb1* Δ *ura3* Δ *ade1* Δ) に電気パルス法で形質転換を行った。これらの株の *LEU2* 遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した（それぞれのプライマーの位置は図29参照）

DL5; 5' - CAGGAGCTACAGAGTCATCG -3' （配列番号109）

DL3; 5' - ACGAGGGACAGGTTGCTCGC -3' （配列番号110）

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーDL5、DL3を用いて、PCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分）×25サイクル）を行った。図29に示すように、プラスミドが *LEU2* 座に組み込まれた株からは、4kbの増幅DNA断片

が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸 (5-FOA) に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーDL5、DL3を用いたPCR (94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分) ×25サイクル) を行った。図29に示すように、URA3遺伝子が欠落した株から1.6kbの増幅DNA断片が検出された。このoch1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ leu2 Δ 株をOgataea minuta YK2株と命名した。

〔実施例35〕 LEU2遺伝子を選択マーカーとしたAOXI遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例(33-2)に記載のLEU2遺伝子を含むpOMLE1をPmaCI切断後、ApaIリンカーとライゲーションし、BamHIで切断し平滑末端処理後、KpnIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドよりLEU2遺伝子発現カセットを3.3kbのApaI-KpnI断片として単離し、pOMex1UのApaI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをSpeIで切断し平滑末端処理後、NotIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドをpOMex7Lとした(図30)。

実施例25で得られたSaccharomyces cerevisiae由来インベルターゼ遺伝子を含む約1.4kbのSpeI-BglIII断片をpOMex7LのXbaI-BamHI間に導入し、pOMIV7Lを作成した。pOMIV7LをNotIで切断後、実施例(34-2)に記載のOgataea minuta YK2株に導入した。形質転換株をBYPM培地(0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ポリペプトン、100mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0、0.5%メタノール)で培養し、遠心分離によって得られた培養上清について以下の方法でインベルターゼ活性を測定した。すなわち適宜希釈した2μlの培養上清と、200μlの2%ショ糖を含む100mM酢酸ナトリウムバッファー(pH5.0)を混合した後、37℃で10~30分間インキュベートし、反応液2μlを500μlのグルコーステスト・ワコー(和光純薬)を加え発色させた。インベルターゼによって遊離したグルコースにより発色する吸光度(505nm)を測定した。最も生産性の高かった酵母株Ogataea minuta YK2-IVL1株では培地中に著量のインベルターゼが生産されていた。

〔実施例36〕 Ogataea minutaのYPSI遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりYPSI遺伝子、及びその塩基配列決定を行なった。

(36-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (登録番号 ; NP_013221) 及び Candida albicans (AAF66711) 由来の YPSI 遺伝子産物で保存されているアミノ酸配列

DTGSSDLW (配列番号 1 1 1)

FGAIDHAK (配列番号 1 1 2)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PLE5; 5' - GAYACNGGHTCNTCNGAYYTNTGG -3' (配列番号 1 1 3)

PLE3; 5' - TTYGGHGCNATYGAYCAYGCNAA -3' (配列番号 1 1 4)

プライマーPYP5はアミノ酸配列DTGSSDLWに対応し、プライマーPYP3はアミノ酸配列FGAIDHAKに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPYP5、PYP3を用いて、PCR ((94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びCandida albicans由来のYPSI遺伝子産物のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.6kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(36-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(36-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約4kbのEcoRI断片にYPSI遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、4kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をEcoRIで切断しBAP処理したpUC118とライゲーションした後、大腸菌DH5 α 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

約2000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた4個の陽性クローンの中から、プラ

スミドpOMYP1を保持するクローンを選抜した。

(36-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMLE1のEcoRI領域(図31)の塩基配列をプライマーウォーキング法により決定し、配列番号115に示す塩基配列が得られた。

配列番号115の塩基配列には、1712番目から始まり、3523番目で終わる1812塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号116)と *Saccharomyces cerevisiae* 及び *Candida albicans* 由来の *YPSI* 遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ40%、27%のアミノ酸が同一であった。

(実施例37) *Ogataea minuta* の *YPSI* 遺伝子破壊株の作製

Ogataea minuta の *URA3* 遺伝子をマーカーとした形質転換によって、*YPSI* 遺伝子を破壊した。

(37-1) *YPSI* 遺伝子破壊ベクターの作製

図31に示すように、*YPSI* 構造遺伝子の約300bp領域を *URA3* 遺伝子に置換したプラスミドpDOMYP1を作製した。*YPSI* 遺伝子破壊株より再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持った *URA3* 遺伝子をマーカーとして用いた。実施例(31-1)に記載のpROMUHTをHindIIIで切断し、平滑末端処理後、EcoT22Iリンカーとライゲーションをした。得られたプラスミドをpROMUTTと命名した。

pOMYP1をEcoRIで切断し、得られた断片をEcoRIで切断しBAP処理したpBluescript KS+とライゲーションした。得られたプラスミドをpOMYP2と命名した。pOMYP2をBsiWIで切断し平滑末端処理後、EcoT22Iリンカーを挿入した。得られたプラスミドをpOMYP3と命名した。pOMYP3のEcoT22I間にpOMURTTから単離した3.3kbのEcoT22I断片を挿入した。得られたプラスミドをpDOMYP1と命名した。

(37-2) 形質転換

実施例(37-1)で得られたpDOMYP1をBamHIとClaIで切断して、実施例(17-2)で得られた *Ogataea minuta* TK11株 (*och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ*) に電気パルス法で形質転換を行った。これらの株の *YPSI* 遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した(それぞれのプライマーの位置は図

3 2 参照)

DY5; 5' - CTCAAGGCCTGGAGACTACG -3' (配列番号 1 1 7)

DY3; 5' - CGGGATTCCCGAGTCGCTCACC -3' (配列番号 1 1 8)

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーDY5、DY3を用いて、PCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分) ×25サイクル) を行った。図8に示すように、プラスミドが YPS1座に組み込まれた株からは、3.7kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸 (5-FOA) に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーDY5、DY3を用いたPCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分) ×25サイクル) を行った。図 3 2 に示すように、URA3遺伝子が欠落した株から、1.2Kbの増幅DNA断片が検出された。この och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ yps1 Δ 株を Ogataea minuta YK3株と命名した。

〔実施例 3 8〕 Ogataea minuta YPS1遺伝子破壊株へのヒト抗体遺伝子の導入および発現

実施例 (37-2) で得られた Ogataea minuta YK3株 (och1 Δ ktr1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ yps1 Δ) に抗ヒトG-CSF軽鎖遺伝子 (配列番号 9 1)、及び重鎖遺伝子 (配列番号 9 2) を導入した。実施例 2 8 に記載の抗G-CSF軽鎖遺伝子、及び重鎖遺伝子を発現するプラスミドベクターをNotI消化後、Ogataea minuta YK3株を順次、形質転換した。得られた形質転換体を実施例 2 8 に記載の方法にて培養上清中に抗体を産生している形質転換体を選択し、Ogataea minuta YK3株由来の抗体生産株を Ogataea minuta YK3-IgB1株と命名した。

次に Ogataea minuta YK3-IgB1株に Aspergillus saitoi 由来 α-1,2マンノシダーゼ遺伝子を導入した。実施例 2 3 で作成したプラスミドpOMaM1Uを用いて、実施例 2 4 に記載の方法にて、形質転換後、得られた形質転換体より α-1,2マンノシダーゼ発現株の選抜を行った。その結果、得られた株を Ogataea minuta YK3-IgB-aM株と命名した。 Ogataea minuta YK3-IgB-aM株、及びコントロール株として実施例28で作成された Ogataea minuta TK9-IgB-aM株をBYPMG培地で28℃、72時間培養し、遠心分離によって得られた培養上清を用いてウエスタン解析を行った。その結果を図 3 3 に示すが、コントロール株である Ogataea minuta TK9-IgB-aM

株により生産された抗体分子は重鎖が分解しているものが検出されたが、Ogataea minuta YK3-IgB-aM株は重鎖の分解が抑制されていた。

またOgataea minuta YK3-IgB-aM株の培養上清をアミコンYM76限外ろ過膜で濃縮、脱塩処理後、ProteinAカラムクロマトグラフィー (Hi-Trap ProteinA HP、アマシャムファルマシアバイオテク) に供し、グリシン-塩酸pH3.0にて溶出することにより抗体画分を精製した。これらの抗体精製サンプルを用いてウエスタン解析を行った (図34)。非還元のSDS-PAGEの結果から主に軽鎖2分子、重鎖2分子で構成される完全長の抗体分子が生産されていることが解った。この精製抗体のG-CSFとの結合性については実施例28に記載の方法で実施し結合することを確認した。更に抗体を透析後、凍結乾燥し実施例11に記載の方法に準じてPA化N結合型糖鎖を調製、順相カラムによるサイズ分析を行い、Man5GlcNAc₂の哺乳類型ハイマンノース型糖鎖を有することを確認した。

〔実施例39〕 実施例38で作成されたヒト抗体生産株への分子シャペロン Protein Disulfide Isomerase (PDI) 遺伝子の導入および発現

Ogataea minuta YK3-IgB1-aM株は培養上清に微量の抗体しか産生しておらず、一方、菌体抽出物を用いたウエスタン解析の結果菌体内に著量の抗体が蓄積されていることが確認された (図35、レーン1, 5)。抗体蛋白が十分にホールディングされていないことが推察されたので、分子シャペロンである、Protein Disulfide Isomerase (PDI) 遺伝子の発現を試みた。PDI遺伝子の発現のために、ハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとしたAOXI遺伝子プロモーターによりPDI遺伝子を発現するプラスミドの構築を行った。

Saccharomyces cerevisiaeのPDI遺伝子 (M62815) を取得するために、PDI遺伝子のN末端、C末端に相当するプライマーを合成した。

PDI5 ; 5' -TCTAGAATGAAGTTTTCTGCTGGTGCCGTCCTG-3' (配列番号119)

PDI3 ; 5' -GGATCCTTACAATTCATCGTGAATGGCATCTTC-3' (配列番号120)

Saccharomyces cerevisiae S288C株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPDI5とPDI3を用いたPCR ((94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル) を行った。増幅された1.5kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するク

ローンを選抜した。Saccharomyces cerevisiaeのPDI遺伝子はSpeI-BamHI断片として単離することができる。

次に(21-5)で得られたOgataea minuta AOXI遺伝子プロモーターとターミネーターによる発現カセット、及びハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして含む発現プラスミドpOMex5HのXbaI-BamHI間に上記PDI遺伝子を含むXbaI-BamHI断片を挿入した。このプラスミドをpOMex5H-PDIと命名した。

pOMex5H-PDIをNotI消化後、Ogataea minuta YK3-IgB1-aM株を形質転換した。得られた形質転換体をBYPMG培地で培養し、遠心分離によって得られた培養上清について、実施例38と同様の方法にてウエスタン解析を行い、培養上清中に抗体を産生している形質転換体を選択し、Ogataea minuta YK3-IgB-aM株由来の抗体生産株をOgataea minuta YK3-IgB-aM-P株と命名した。これらの株は分子シャペロンを導入していない元株Ogataea minuta YK3-IgB-aM株と比較して培養上清中に著量の完全長の抗体分子を産生しており、(図35、レーン4)、また菌体内に蓄積している抗体量も減少していた(図35、レーン6)。

またOgataea minuta YK3-IgB-aM株の培養上清を実施例38に記載の方法にて抗体画分を精製した。抗体画分を透析後、凍結乾燥し実施例11に記載の方法に準じてPA化N結合型糖鎖を調製、順相カラムによるサイズ分析を行い、Man₅GlcNAc₂の哺乳類型ハイマンノース型糖鎖を有することを確認した。

産業上の利用可能性

本発明による遺伝子工学的手法により新規に育種した糖鎖変異メチロトロフ酵母を用い、ヒトなど哺乳類細胞の生産するハイマンノース型と同一の中性糖鎖、あるいは同一の中性糖鎖を有する糖蛋白質を多量かつ純度よく生産することができる。また更に当該変異株に哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を導入することにより、ハイブリッド型、複合型等の哺乳類型糖鎖、あるいは哺乳類型糖鎖を有する蛋白質を効率的に生産することができる。本発明における酵母株、糖蛋白質は医薬品などに利用することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本

明細書にとり入れるものとする。

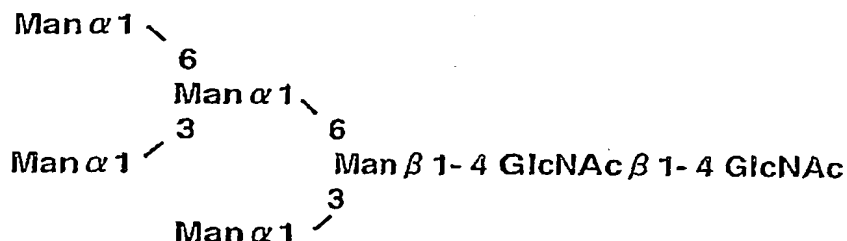
)

)

請 求 の 範 囲

1. 哺乳類型糖鎖を製造し得るメチロトロフ酵母の作製方法であって、
 - 1) メチロトロフ酵母における α -1, 6-マンノシルトランスフェラーゼをコードする OCHI遺伝子を破壊する工程、及び
 - 2) α -1, 2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、を含む、上記方法。
2. 哺乳類型糖鎖が下記構造式 ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) によって示される、請求項 1 に記載の方法。

構造式2



3. メチロトロフ酵母が Pichia、Hansenulla、Candida、または Ogataea 属に属する酵母である、請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. メチロトロフ酵母が Ogataea minuta である、請求項 1 または 2 に記載の方法。
5. メチロトロフ酵母が Ogataea minuta IF010746 株由来の株である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

6. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子をメタノール誘導性プロモーターの制御下において発現させる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
7. メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子のプロモーターである、請求項6に記載の方法。
8. アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子が Ogataea minuta 由来の遺伝子である、請求項7に記載の方法。
9. 導入する α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子に酵母小胞体 (ER) 滞留シグナル (HEDL) を付加することを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。
10. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子が Aspergillus saitoi 由来の遺伝子である、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。
11. 更に異種遺伝子を導入する工程を含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。
12. 発現ベクターを用いて異種遺伝子を導入して発現させる、請求項11に記載の方法。
13. 発現ベクターがメタノール誘導性プロモーターを含む、請求項12に記載の方法。
14. メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子のプロモーターである、請求項13に記載の方法。
15. アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子が Ogataea minuta 由来の遺伝子

である、請求項 1 4 に記載の方法。

1 6. 発現ベクターがグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子由来のプロモーターを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

1 7. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質のN型糖鎖の20%以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか1項に記載の方法。

1 8. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質のN型糖鎖の40%以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか1項に記載の方法。

1 9. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質のN型糖鎖の60%以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか1項に記載の方法。

2 0. 産生される異種遺伝子のコードする蛋白質のN型糖鎖の80%以上が構造式 2 によって示される哺乳類型糖鎖である、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか1項に記載の方法。

2 1. 異種遺伝子のコードする蛋白質がヒト由来である、請求 1 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

2 2. 異種遺伝子のコードする蛋白質が抗体またはその断片である、請求項 1 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

2 3. 請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法によって作製されるメチロトロフ酵母。

24. 請求項23に記載のメチロトロフ酵母を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質を生産する方法。

25. 請求項24に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質。

26. 実質的に配列番号16で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素 (URA3) 遺伝子DNA。

27. 実質的に配列番号15で示される塩基配列からなる URA3 遺伝子DNA。

28. 実質的に請求項26または27に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

29. 請求項28に記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea minuta 株。

30. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、請求項29に記載の Ogataea minuta 株。

31. 実質的に配列番号28で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、ホスホリボシル-アミノ-イミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素 (ADE1) 遺伝子DNA。

32. 実質的に配列番号27で示される塩基配列からなる ADE1 遺伝子DNA。

33. 実質的に請求項31または32に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

34. 請求項33に記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea minuta株。

35. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、請求項34に記載の Ogataea minuta株。

36. 実質的に配列番号100で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、イミダゾール-グリセロール-リン酸-デヒドラターゼ (HIS3) 遺伝子DNA。

37. 実質的に配列番号99で示される塩基配列からなる HIS3遺伝子DNA。

38. 実質的に請求項36または37に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

39. 請求項38に記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea minuta株。

40. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、請求項39に記載の Ogataea minuta株。

41. 実質的に配列番号108で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (LEU2) 遺伝子DNA。

42. 実質的に配列番号107で示される塩基配列からなる LEU2遺伝子DNA。

43. 実質的に請求項41または42に記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

4 4. 請求項 4 3 記載の組換え発現ベクターによって形質転換されたOgataea minuta株。

4 5. Ogataea minuta株が IF010746 株由来の株である、請求項 4 4 に記載のOgataea minuta株。

4 6. 実質的に配列番号 4 3 に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、 α -1,6マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子をコードするOCHI遺伝子 DNA。

4 7. 実質的に配列番号 4 2 で示される塩基配列からなるOCHI遺伝子 DNA。

4 8. 請求項 4 6 または 4 7 に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

4 9. Ogataea minuta株が IF010746 株由来の株である、請求項 4 8 に記載のOgataea minuta株。

5 0. 実質的に配列番号 5 2 で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、プロテイナーゼ A (PEP4) 遺伝子 DNA。

5 1. 実質的に配列番号 5 1 で示される塩基配列からなるPEP4遺伝子 DNA。

5 2. 請求項 5 0 または 5 1 に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

5 3. Ogataea minuta株が IF010746 株由来の株である、請求項 5 2 に記載のOgataea minuta株。

5 4. 実質的に配列番号 5 8 で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴

とする、プロテイナーゼB (PRBI) 遺伝子DNA。

55. 実質的に配列番号57で示される塩基配列からなるPRBI遺伝子DNA。

56. 請求項54または55に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

57. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、請求項56に記載のOgataea minuta株。

58. 実質的に配列番号116で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、YPSI遺伝子DNA。

59. 実質的に配列番号115で示される塩基配列からなるYPSI遺伝子DNA。

60. 請求項58または59に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

61. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、請求項60に記載のOgataea minuta株。

62. 請求項60または61に記載のOgataea minuta株に、異種遺伝子を導入し、該遺伝子のコードする蛋白質を製造する方法。

63. 異種遺伝子が抗体またはその断片をコードする遺伝子である請求項62に記載の方法。

64. メチロトロフ酵母のYPSI遺伝子を破壊することによって、抗体またはその断片の分解を抑制する方法。

65. メチロトロフ酵母がOgataea minuta株である、請求項64に記載の方法。

66. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、請求項65に記載の方法。
67. 抗体のクラスがIgGである、請求項64～66に記載の方法。
68. IgGのサブクラスがIgG1である、請求項67に記載の方法。
69. 抗体がヒト抗体である、請求項64～68のいずれか1項に記載の方法。
70. 実質的に配列番号64で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、KTRI遺伝子DNA。
71. 実質的に配列番号63で示される塩基配列からなるKTRI遺伝子DNA。
72. 請求項70または71に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。
73. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、請求項72に記載のOgataea minuta株。
74. 実質的に配列番号70で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、MNN9遺伝子DNA。
75. 実質的に配列番号69で示される塩基配列からなるMNN9遺伝子DNA。
76. 請求項74または75に記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。
77. Ogataea minuta株がIF010746株由来の株である、請求項76に記載のOgataea minuta株。

78. 実質的に配列番号78で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子DNA。

79. 実質的に配列番号77で示される塩基配列からなる、AOX遺伝子DNA。

80. 実質的に配列番号79で示される塩基配列からなるアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX) のプロモーターを含むDNA。

81. 実質的に配列番号80で示される塩基配列からなる、アルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX) のターミネーターを含むDNA。

82. 請求項80に記載のプロモーターを含むDNA、異種遺伝子、及び請求項81記載のターミネーターを含むDNAを含む遺伝子発現カセット。

83. 請求項82に記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

84. 請求項83に記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea minuta 株。

85. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、請求項84に記載の Ogataea minuta 株。

86. 実質的に配列番号6で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子DNA。

87. 実質的に配列番号5で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子DNA。

88. 実質的に配列番号7で示される塩基配列からなるグリセルアルデヒド-

89. 実質的に配列番号8で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (GAPDH) のターミネーターを含むDNA。

90. 請求項88記載のプロモーターを含むDNA、異種遺伝子、及び請求項89記載のターミネーターを含むDNAを含む遺伝子発現カセット。

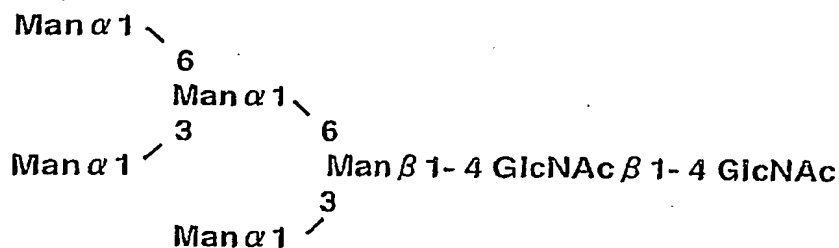
91. 請求項90記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

9 2. 請求項 9 1 記載の組換え発現ベクターによって形質転換された Ogataea
minuta 株。

9 3. Ogataea minuta株が IF010746株由来の株である、請求項 9 2 に記載の Ogataea minuta株。

9.4. 哺乳類型糖鎖が下記構造式 (Man5 GlcNAc2) :

構造式2



によって示される、哺乳類型糖鎖を製造し得る Ogataea minuta 株の作製方法であ
って、

Ogataea minuta株におけるOCH1遺伝子（配列番号42）を破壊する工程、

を含む、上記方法。

95. Ogataea minutaがIF010746株由来の株である請求項94に記載の方法。

96. さらに、

配列番号15で示される塩基配列を有するURA3遺伝子、配列番号27で示される塩基配列を有するADE1遺伝子、配列番号99で示される塩基配列を有するHIS3遺伝子および配列番号107で示される塩基配列を有するLEU2遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも一つ以上の遺伝子を破壊する工程、
を含む、請求項94または95に記載の方法。

97. さらに、

配列番号51で示される塩基配列を有するPEP4遺伝子、配列番号57で示される塩基配列を有するPRB1遺伝子および配列番号115で示される塩基配列を有するYPS1遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも一つ以上の遺伝子を破壊する工程、
を含む、請求項94～96のいずれか1項に記載の方法。

98. さらに、

配列番号63で示される塩基配列を有するKTR1遺伝子及び/または配列番号69で示される塩基配列を有するMNV9遺伝子を破壊する工程、
を含む、請求項94～97のいずれか1項に記載の方法。

99. さらに、

Aspergillus saitoi由来の α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、
を含む、請求項94～98のいずれか1項に記載の方法。

100. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を、請求項83に記載のベクターに導

入して発現させる、請求項 99 に記載の方法。

101. さらに、

PDI遺伝子を導入して発現させる工程、

を含む、請求項 94～100 のいずれか 1 項に記載の方法。

102. PDI遺伝子が、Saccharomyces cerevisiae由来の遺伝子 (M62815) である、請求項 101 に記載の方法。

103. PDI遺伝子を、請求項 83 に記載のベクターに導入して発現させる、請求項 101 または 102 に記載の方法。

104. さらに、

異種遺伝子を導入して発現させる工程、

を含む、請求項 94～103 のいずれか 1 項に記載の方法。

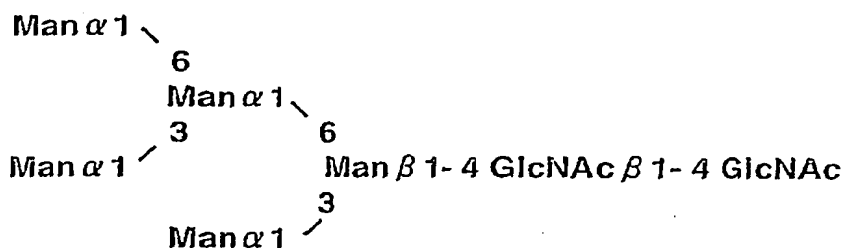
105. 異種遺伝子を請求項 83 に記載のベクターに導入して発現させる工程、を含む、請求項 104 に記載の方法。

106. 請求項 104 または 105 に記載の方法を用いて作製された Ogataea minuta を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質を生産する方法。

107. 請求項 106 に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質。

108. 哺乳類型糖鎖が下記構造式 (Man5 GlcNAc2) :

構造式2



によって示される、哺乳類型糖鎖を製造し得る Ogataea minuta 株の作製方法であ
って、

Ogataea minuta 株における配列番号 4 2 で示される塩基配列を有する OCHI 遺伝子
を破壊する工程、及び

Ogataea minuta 株における配列番号 1 5 で示される塩基配列を有する URA3 遺伝子
を破壊する工程、及び

Ogataea minuta 株における配列番号 5 1 で示される塩基配列を有する PEP4 遺伝子
を破壊する工程、及び

Ogataea minuta 株における配列番号 5 7 で示される塩基配列を有する PRB1 遺伝子
を破壊する工程

を含む、上記方法。

1 0 9. Ogataea minuta 株が IF010746 株由来の株である、請求項 1 0 8 に記載
の方法。

1 1 0. さらに、
配列番号 2 7 で示される塩基配列を有する ADE 1 遺伝子を破壊する工程、
を含む、請求項 1 0 8 または 1 0 9 に記載の方法。

1 1 1. さらに、

配列番号 63 で示される塩基配列を有する KTR1 遺伝子を破壊する工程、を含む、請求項 110 に記載の方法。

112. さらに、

配列番号 99 で示される塩基配列を有する HIS3 遺伝子を破壊する工程、を含む、請求項 111 に記載の方法。

113. さらに、

配列番号 107 で示される塩基配列を有する LEU2 遺伝子を破壊する工程、を含む、請求項 111 に記載の方法。

114. さらに、

1) 配列番号 115 で示される塩基配列を有する YPS1 遺伝子を破壊する工程、を含む、請求項 111 に記載の方法。

115. さらに、

α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、を含む、請求項 108 ~ 114 のいずれか 1 項に記載の方法。

116. α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を、請求項 83 に記載のベクターに導入して発現させる請求項 115 に記載の方法。

117. さらに、

PDI 遺伝子 (M62815) を導入して発現させる工程、を含む、請求項 108 ~ 116 のいずれか 1 項に記載の方法。

118. PDI 遺伝子 (M62815) を、請求項 83 に記載のベクターに導入して発現させる請求項 117 に記載の方法。

119. さらに、
異種遺伝子を導入して発現させる工程、
を含む、請求項108～118のいずれか1項に記載の方法。
120. 異種遺伝子を請求項83に記載のベクターに導入して発現させる工程、
を含む、請求項119に記載の方法。
121. 請求項119または120に記載の方法で作製されたOgataea minuta
株を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する異種遺伝子のコードする蛋白質を生産する方法。
122. 請求項121に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する
異種遺伝子のコードする蛋白質。

図 1

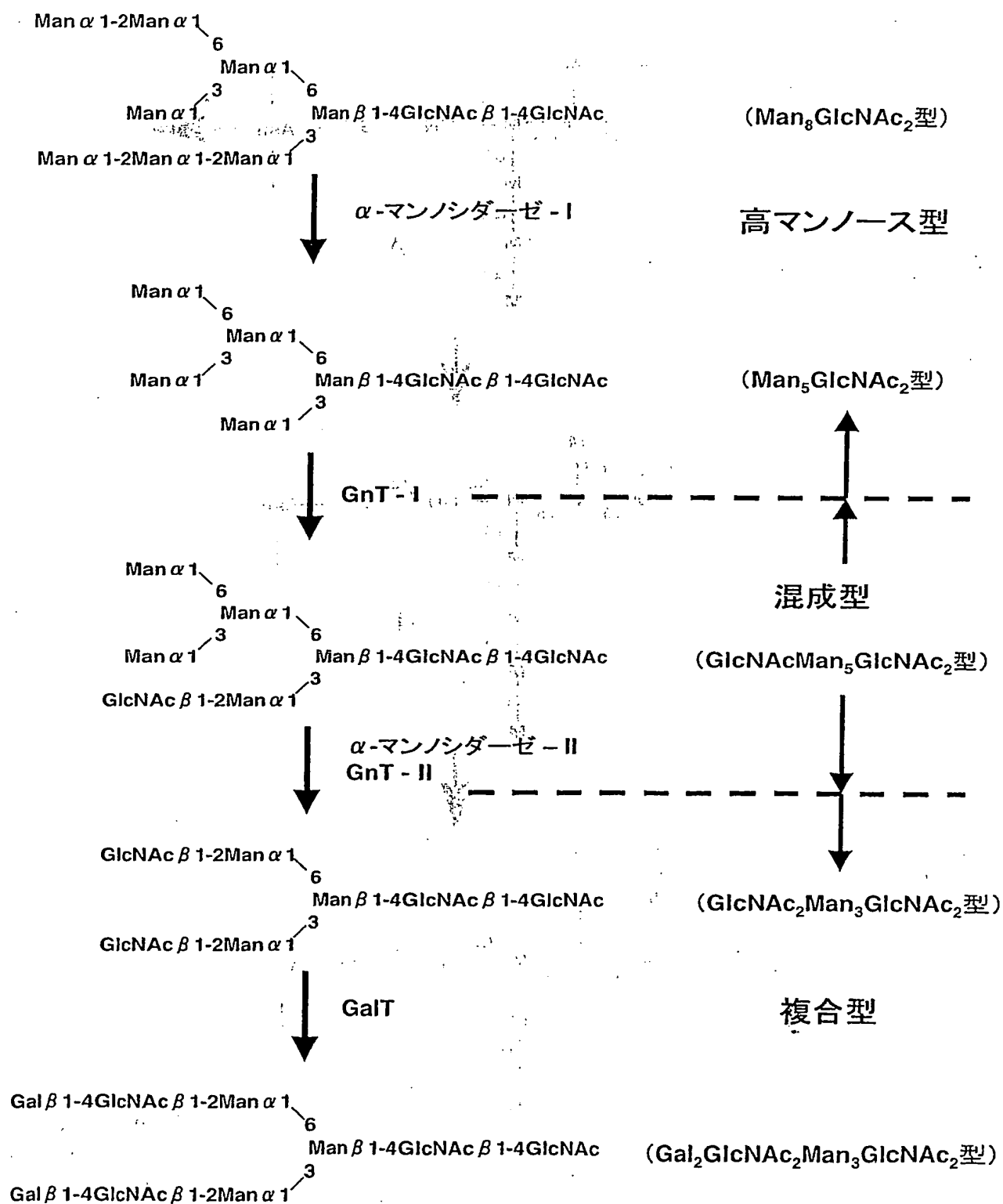


图 2

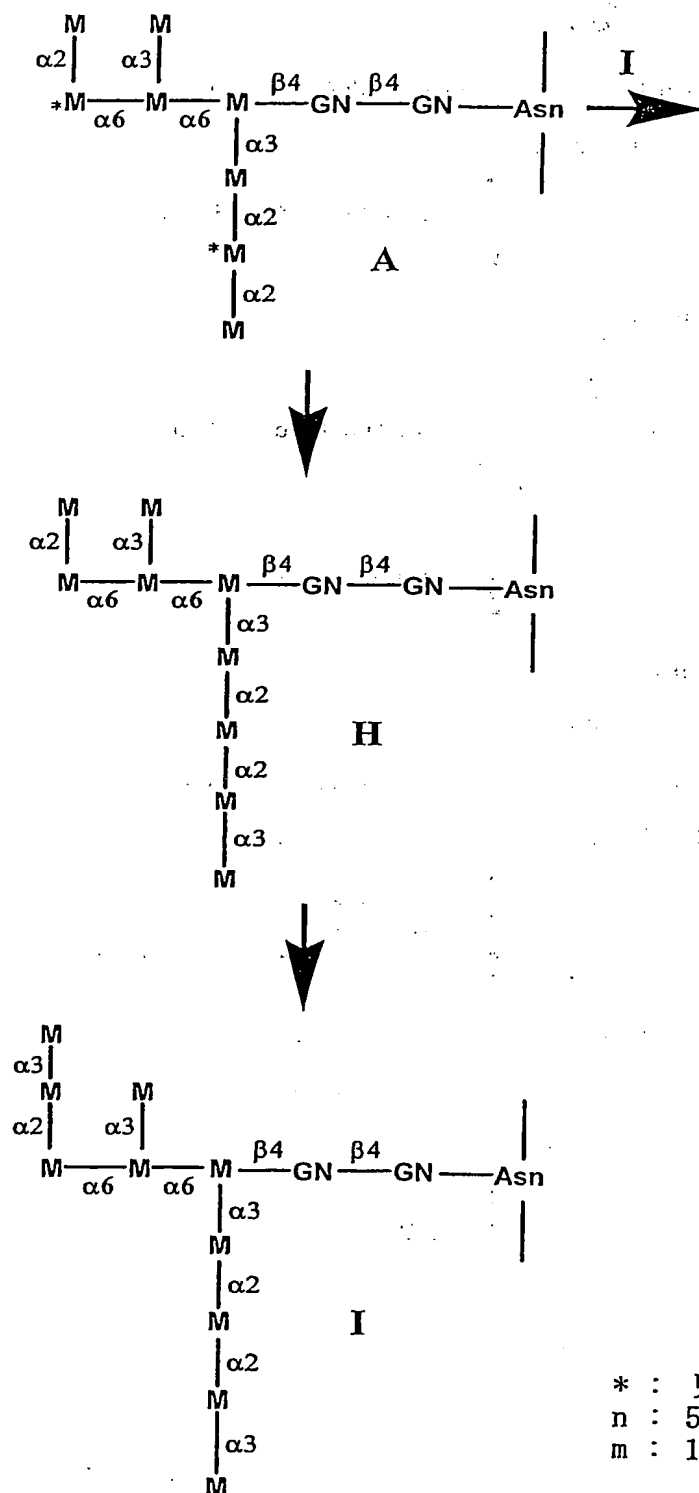


図 2

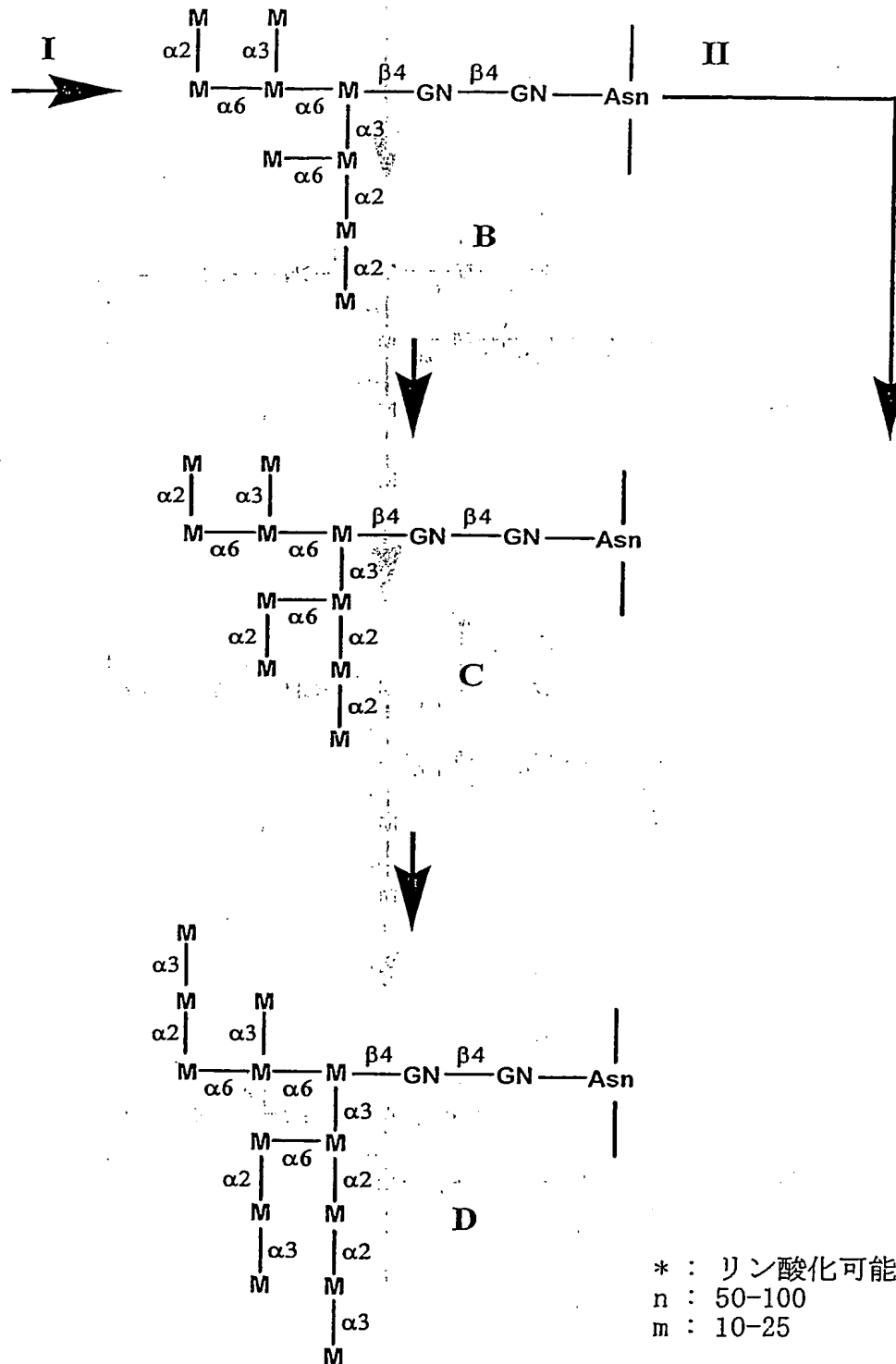
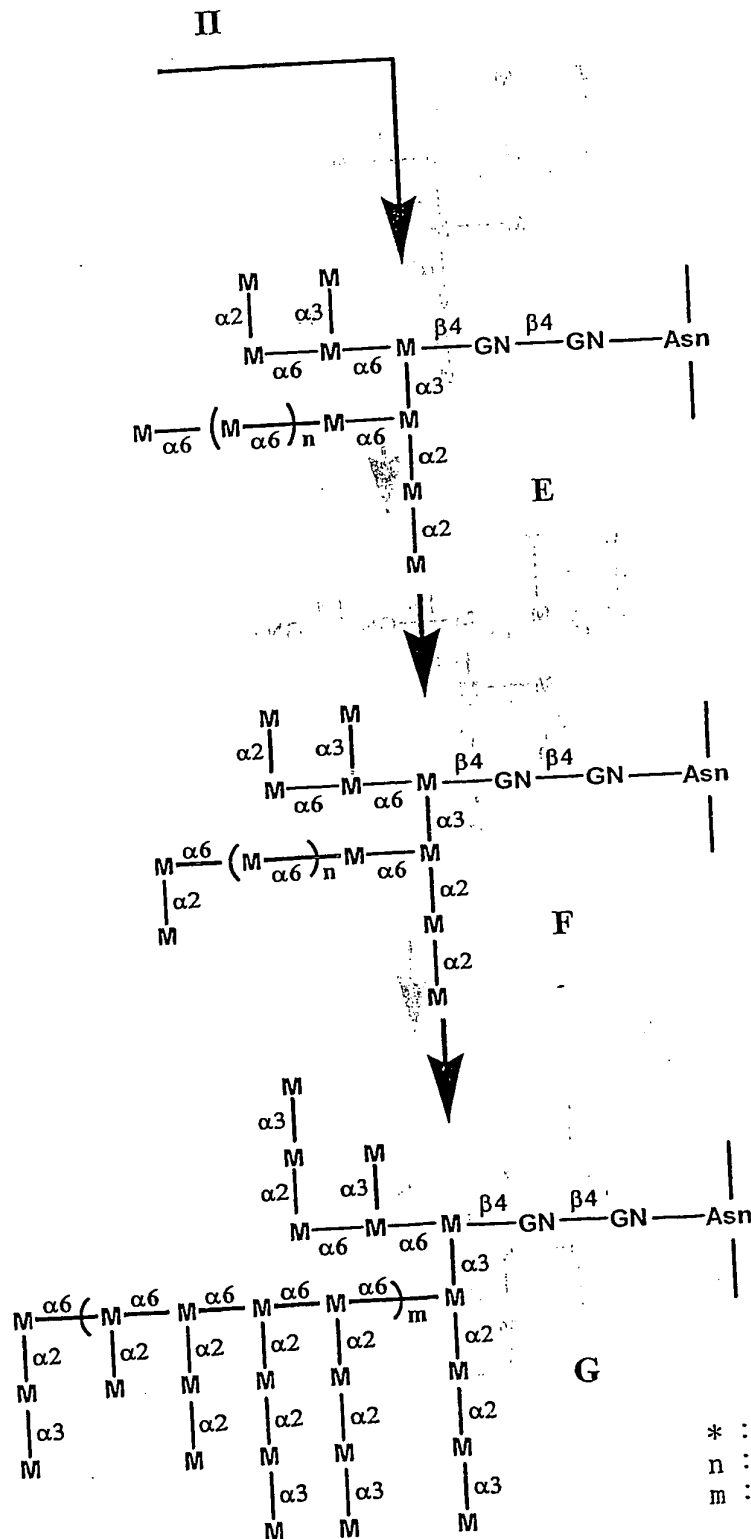


図 2



2/2/26

差替え用紙 (規則26)

図 3

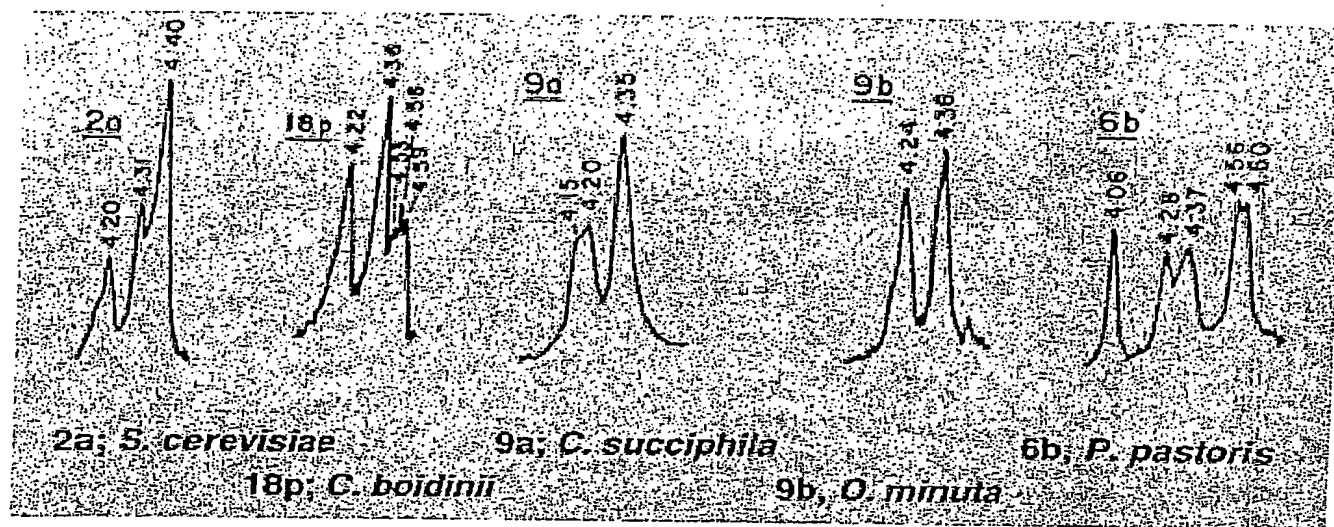
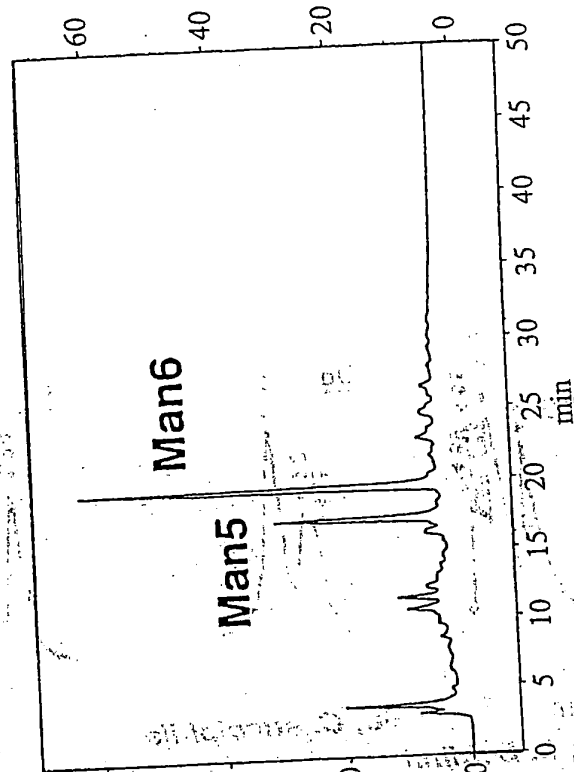


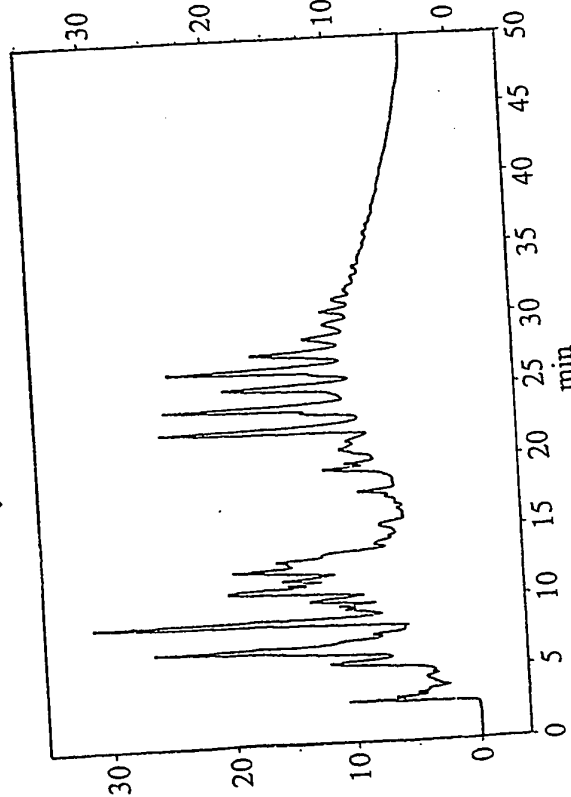
図4

 α -1,2マンノシダーゼ

処理後



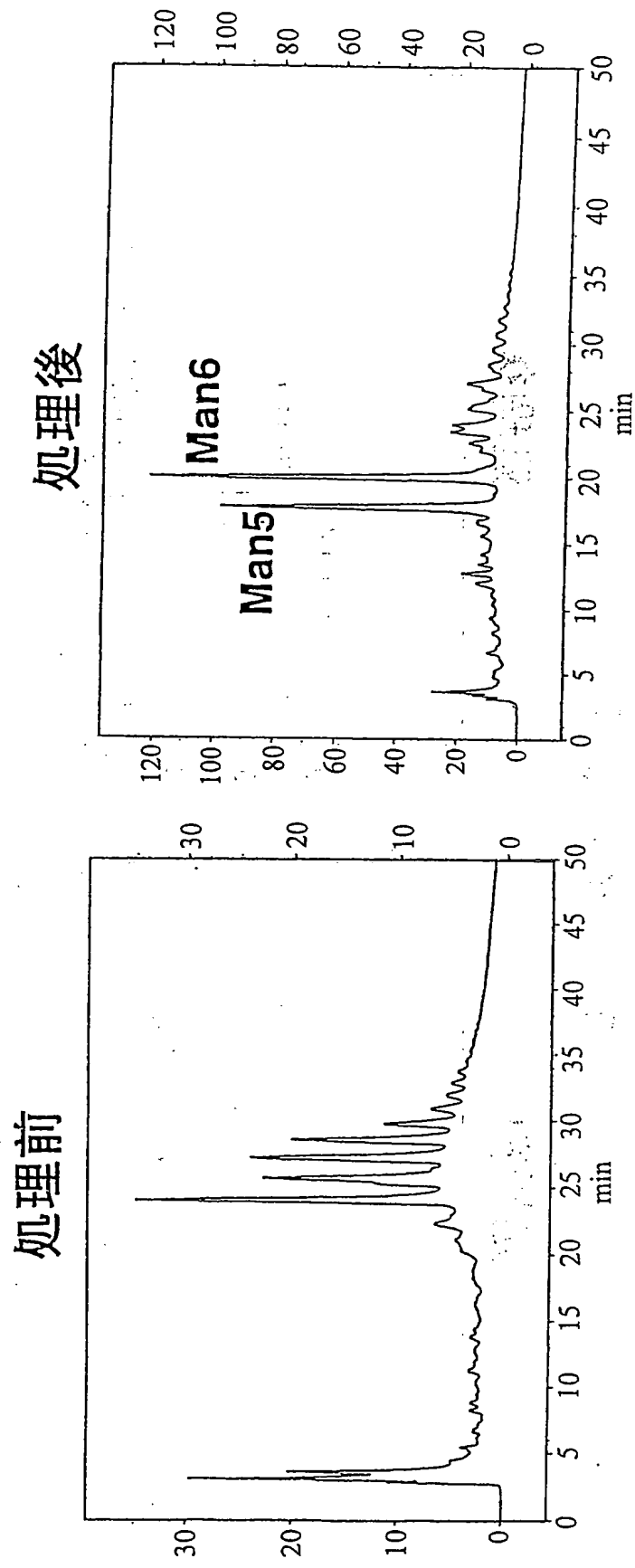
処理前



Ogataea minuta

図4

α -1,2マンノシダーゼ

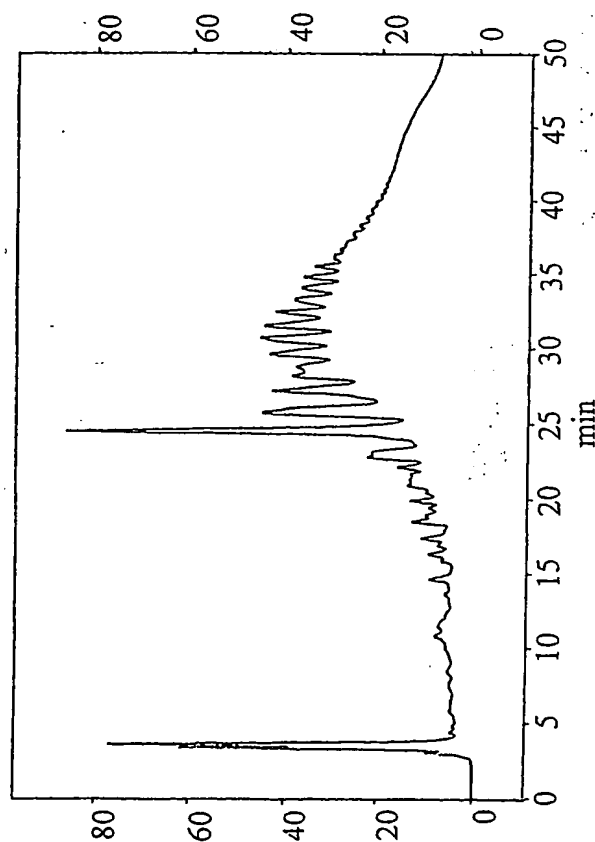


Candida succiphila

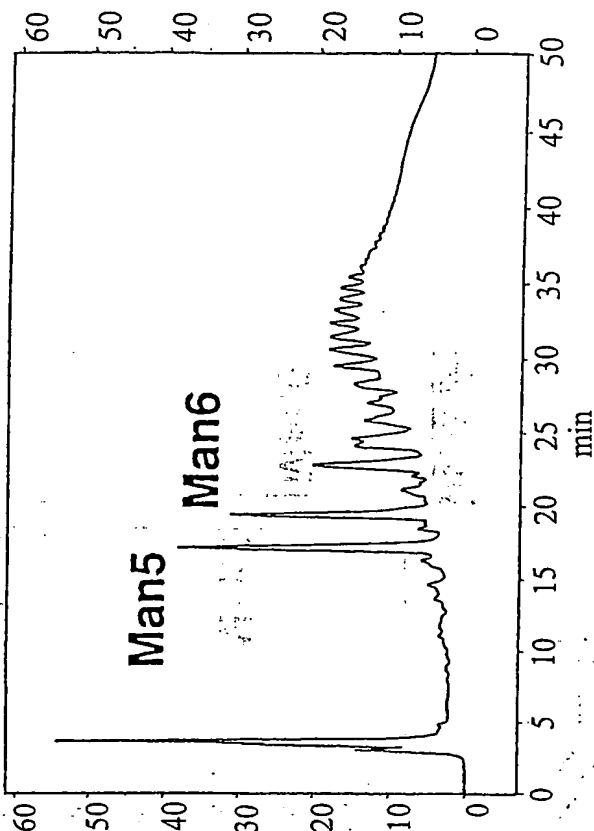
図4

α -1,2マンノシダーゼ

処理前



処理後

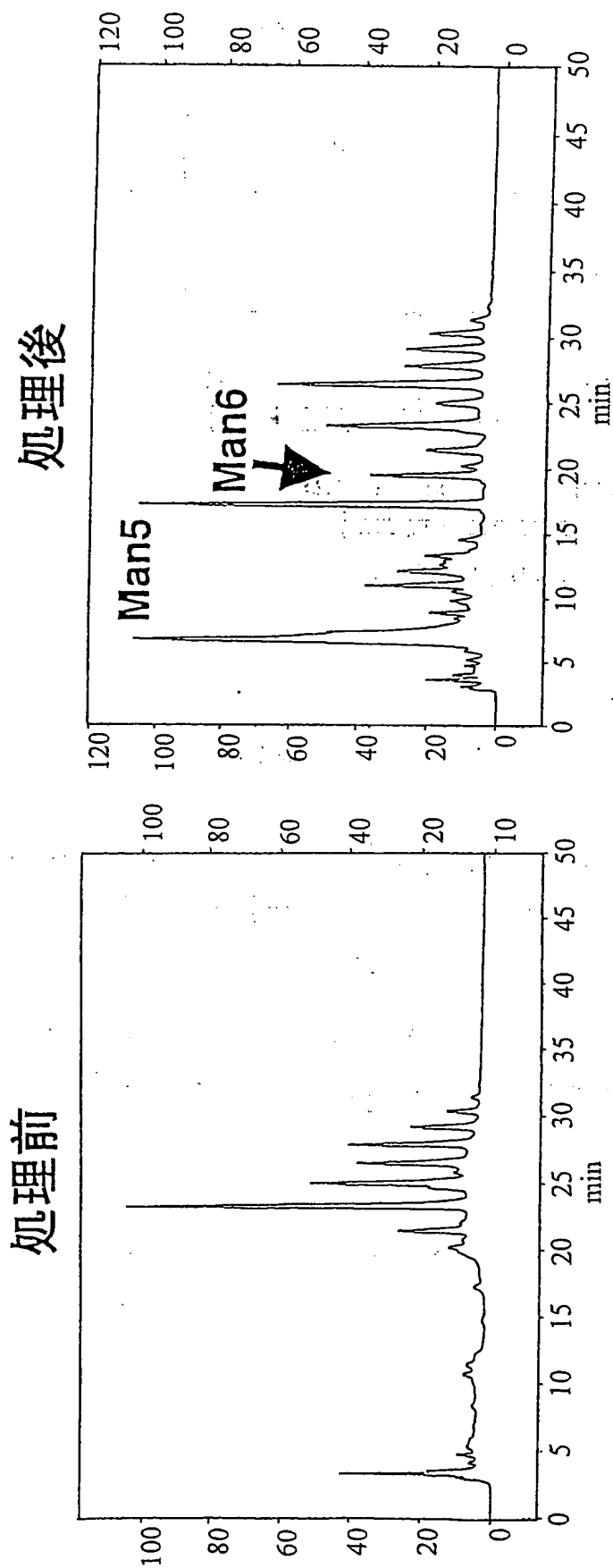


Candida boidinii

4/2/26

図4

α -1,2マンノシダーゼ



Saccharomyces cerevisiae

4/3/26

図 5

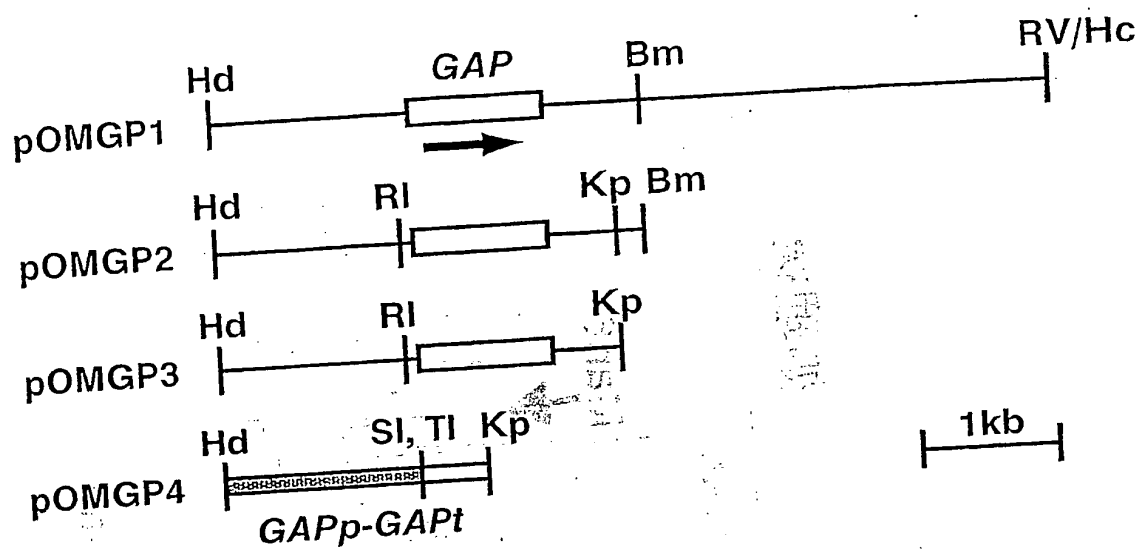


図 6

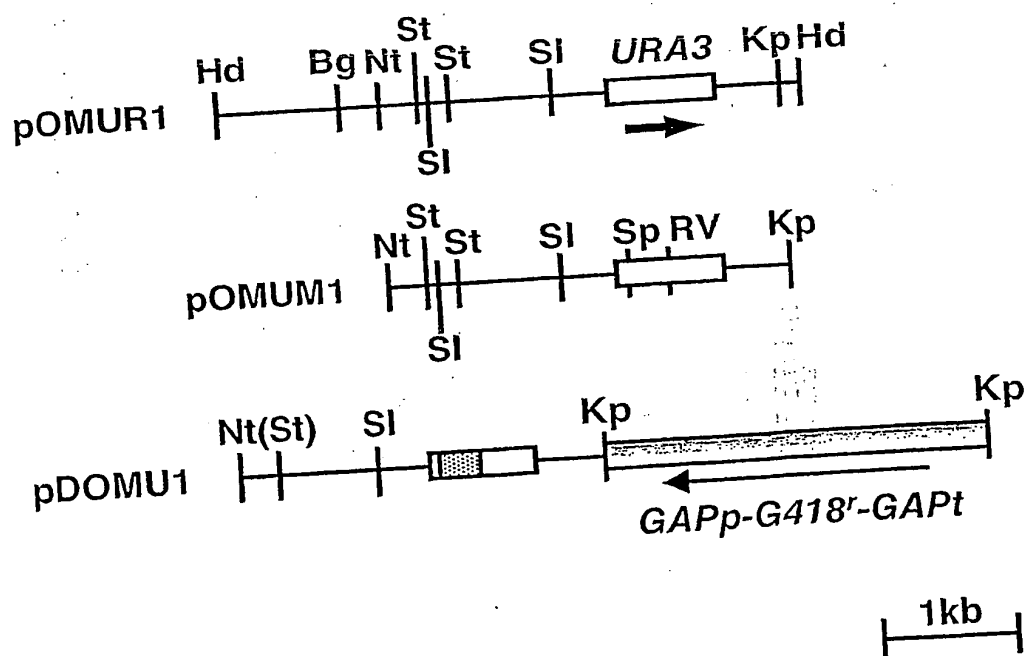


図 7

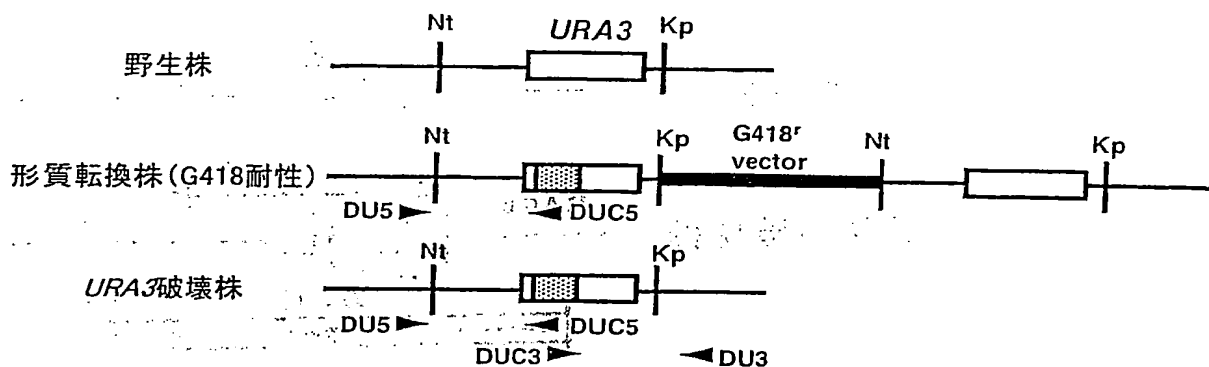


図 8

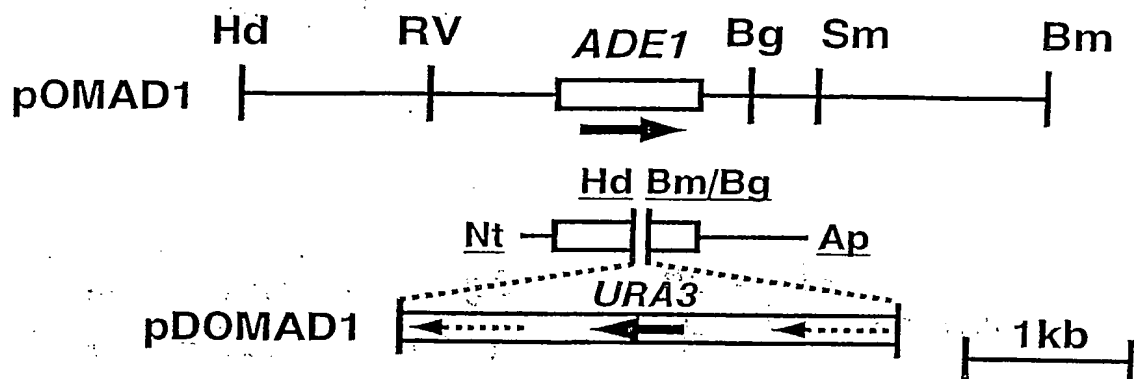


図 9

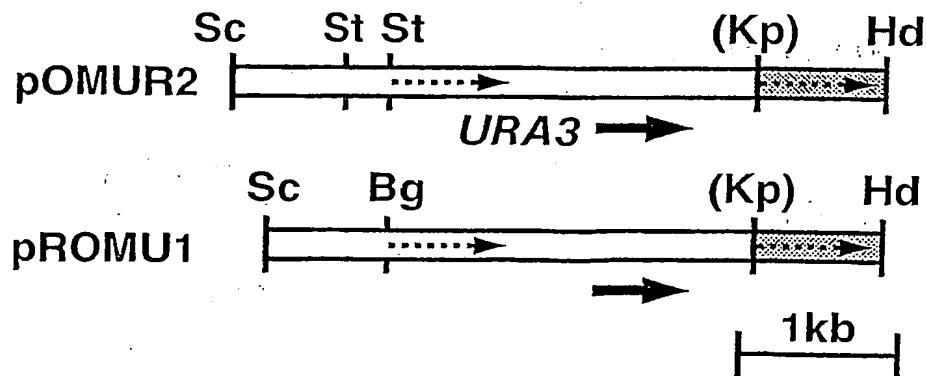


図 1 0

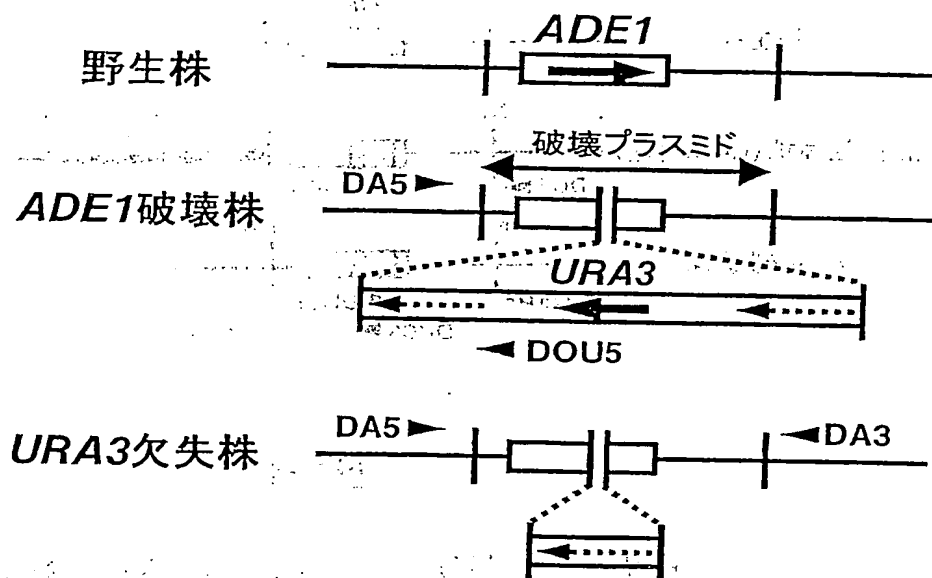


図 1 1

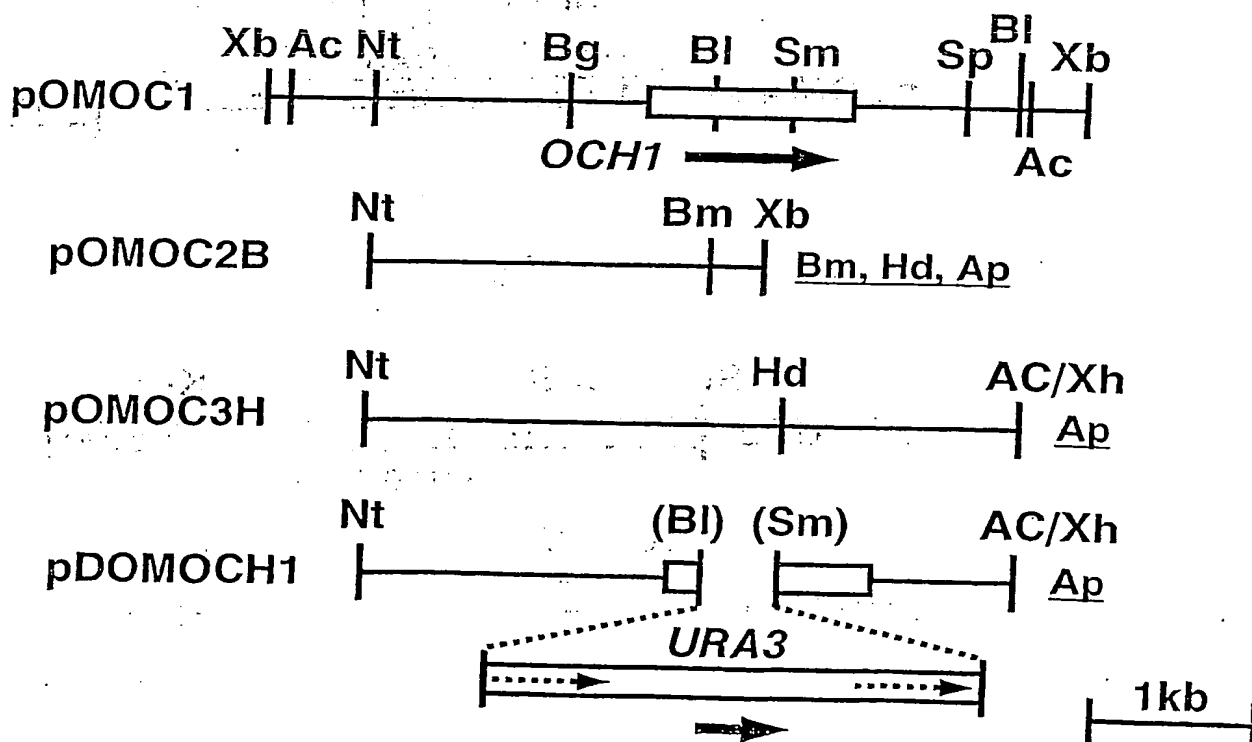


図 1 2

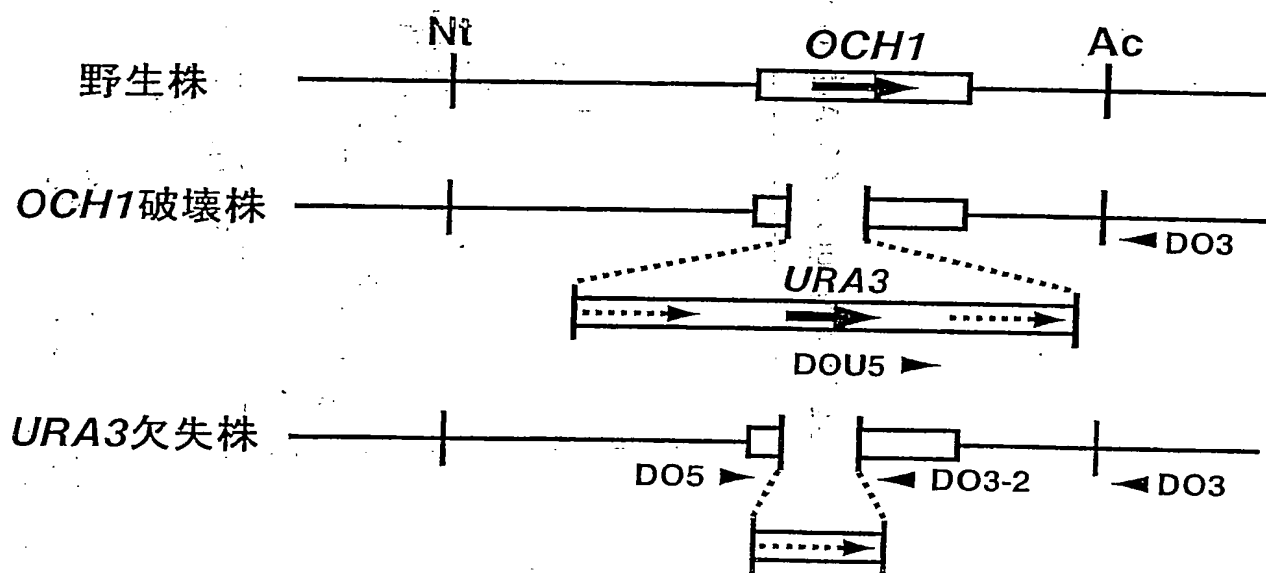
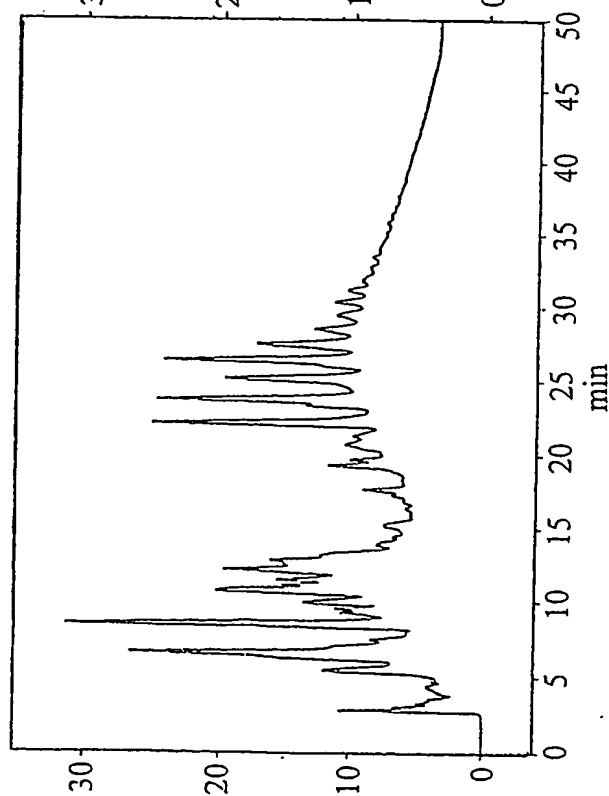
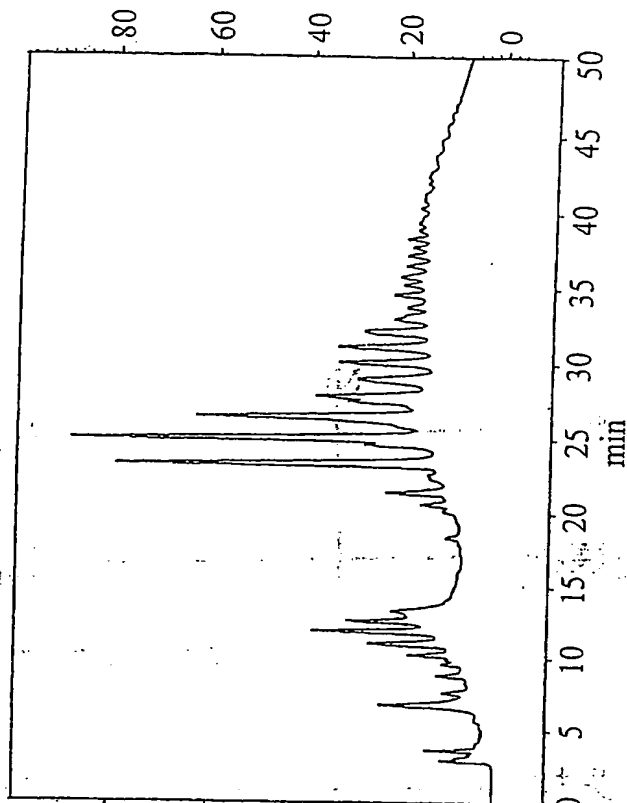


図 13

Ogataea minuta TK 1-3株

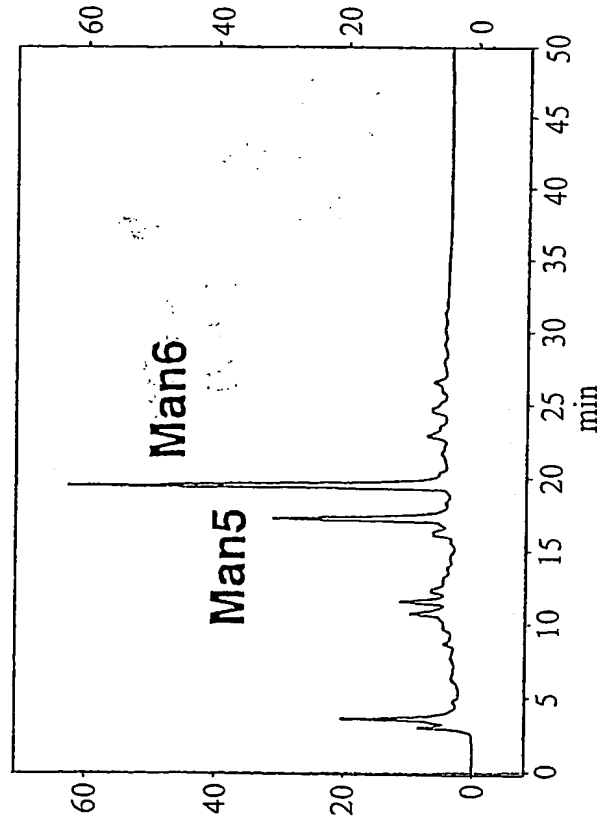


Ogataea minuta TK 3-A株 (OCH1 Δ)

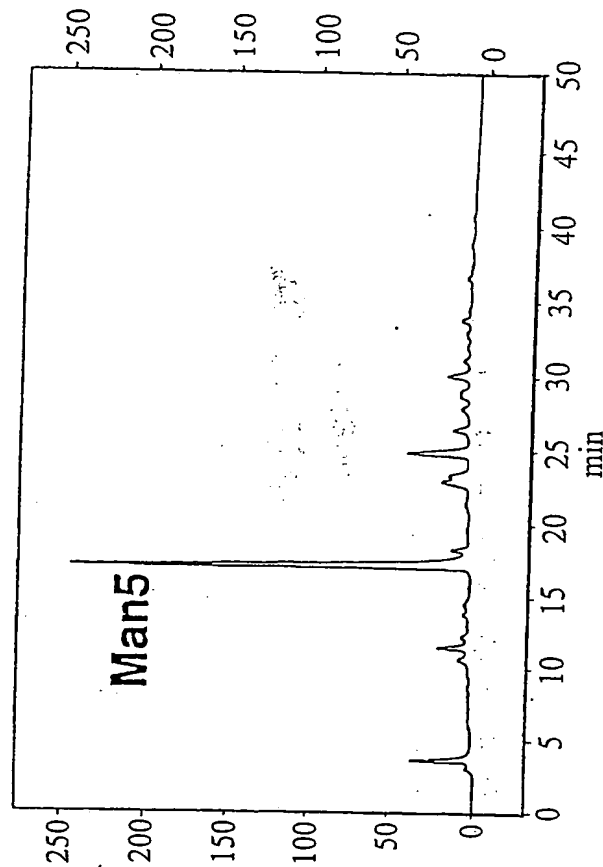


α-1,2マンノシダーゼ消化前
アミドカラム

Ogataea minuta TK 1-3株



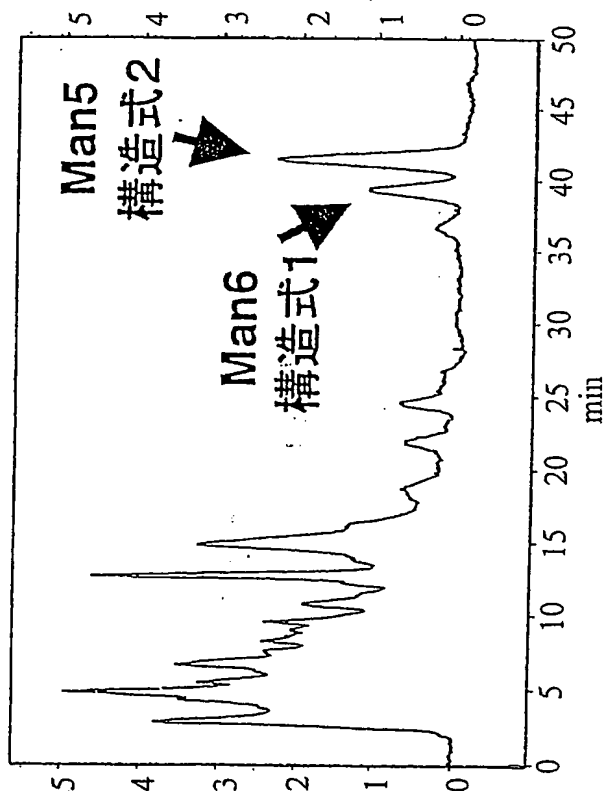
Ogataea minuta TK 3-A株 (OCH1Δ)



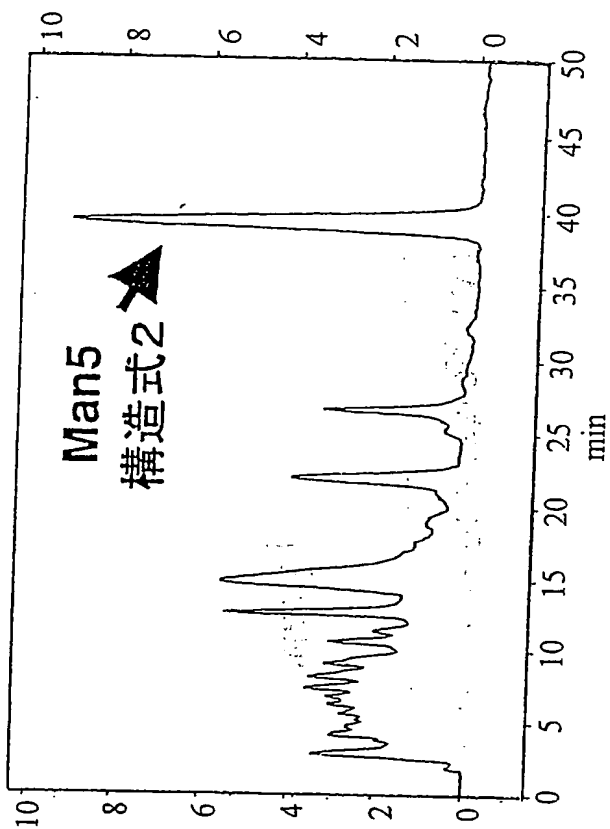
α-1,2マンノシダーゼ消化後
アミドカラム

図 13

Ogataea minuta TK 1-3株



Ogataea minuta TK 3-A株 (OCH1Δ)



逆相カラム

図 1 4

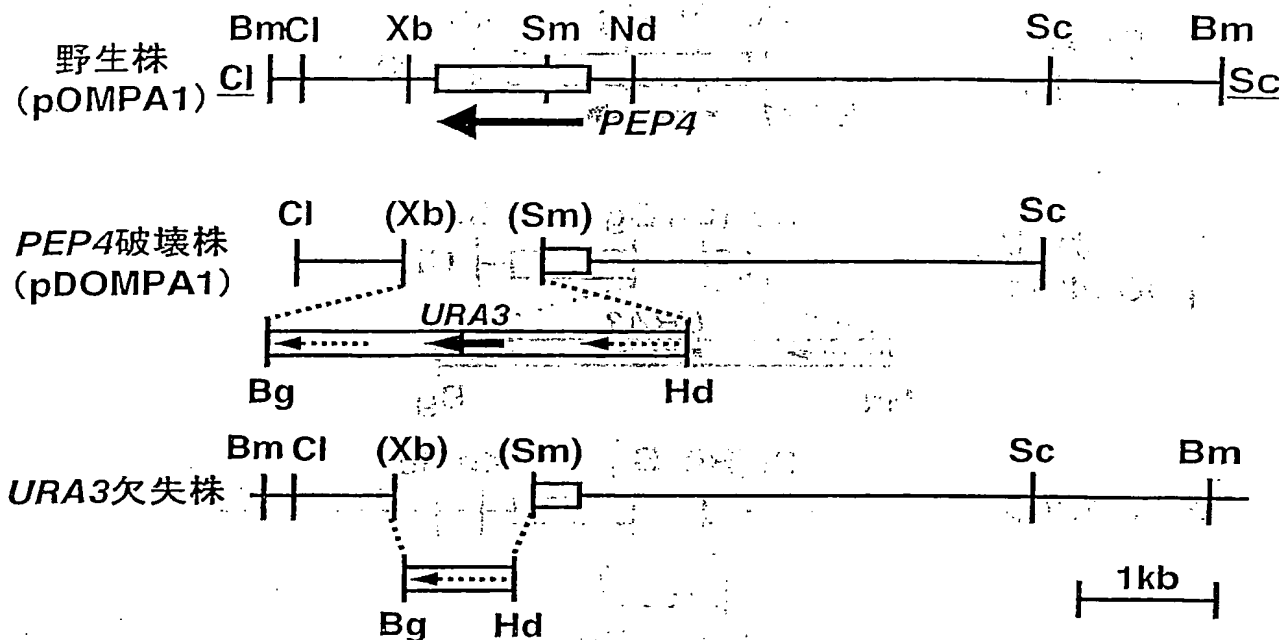


図 1 5

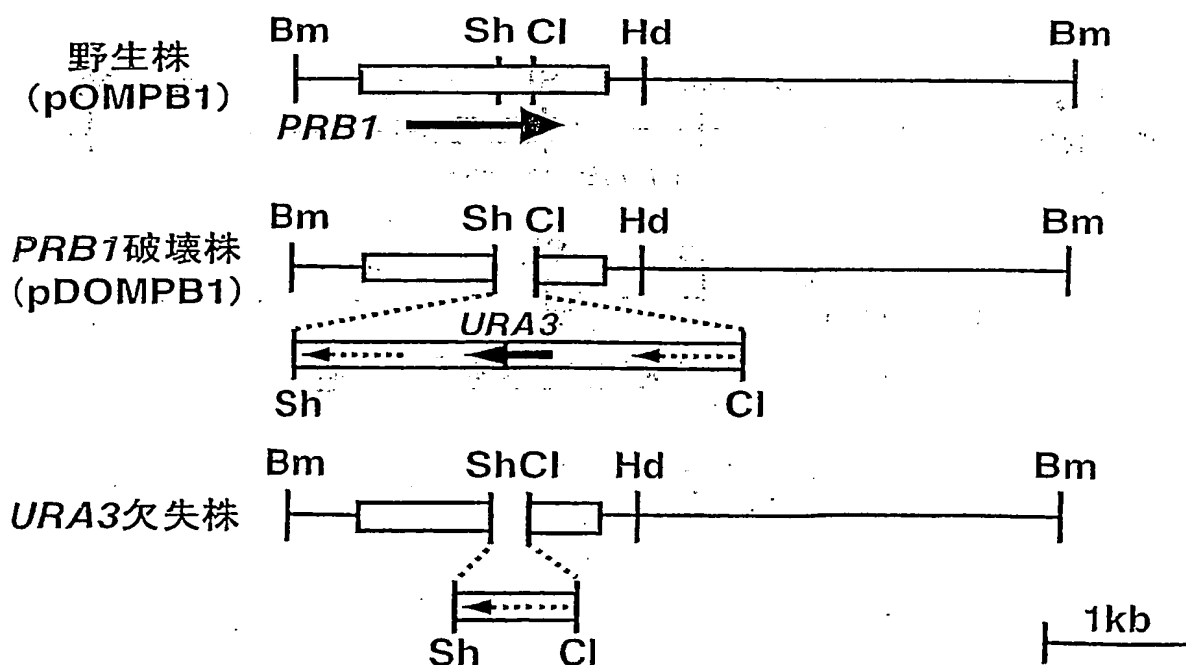


図 1 6

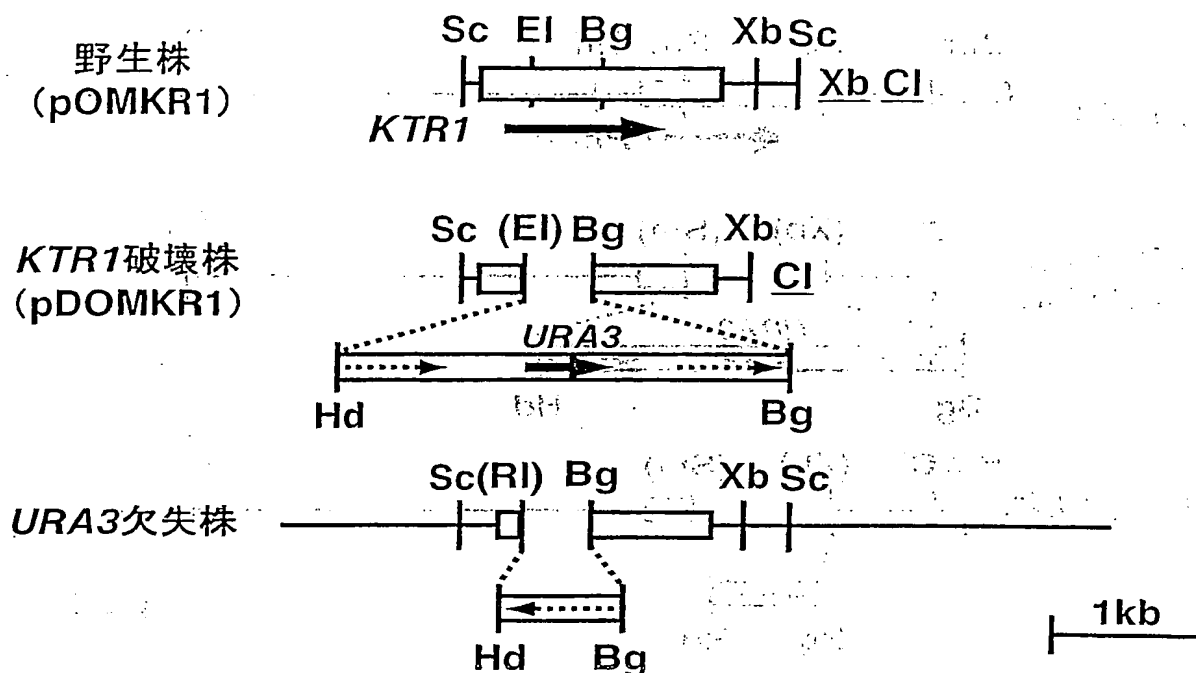
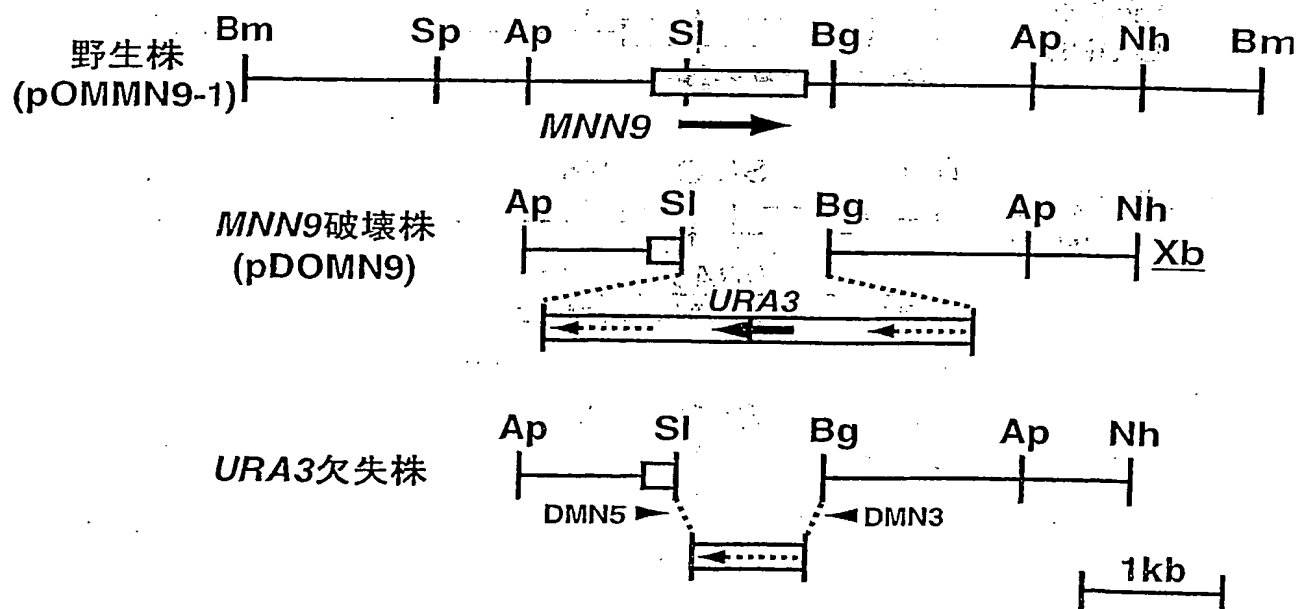


図 1 7



18A

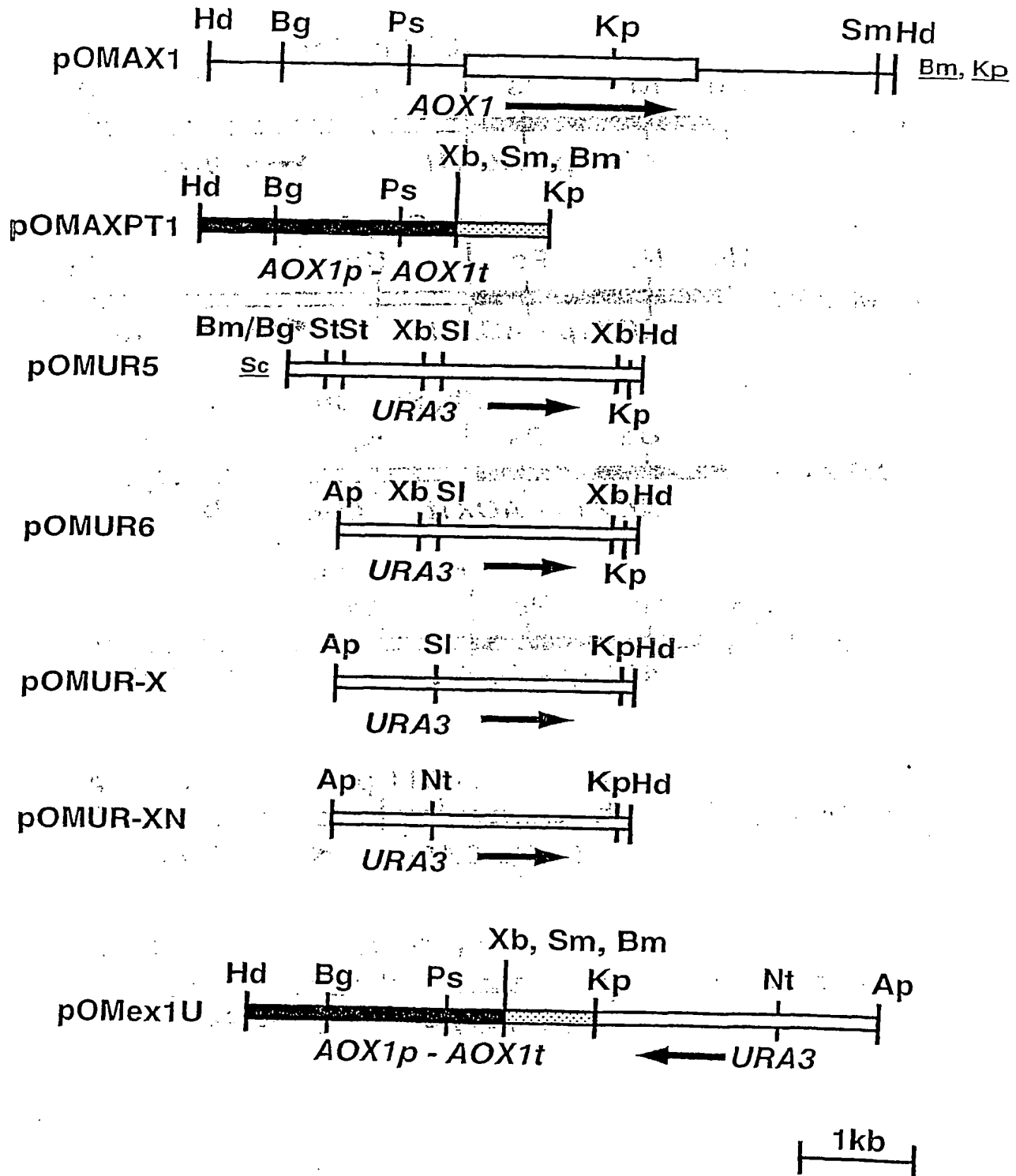


図 18 B

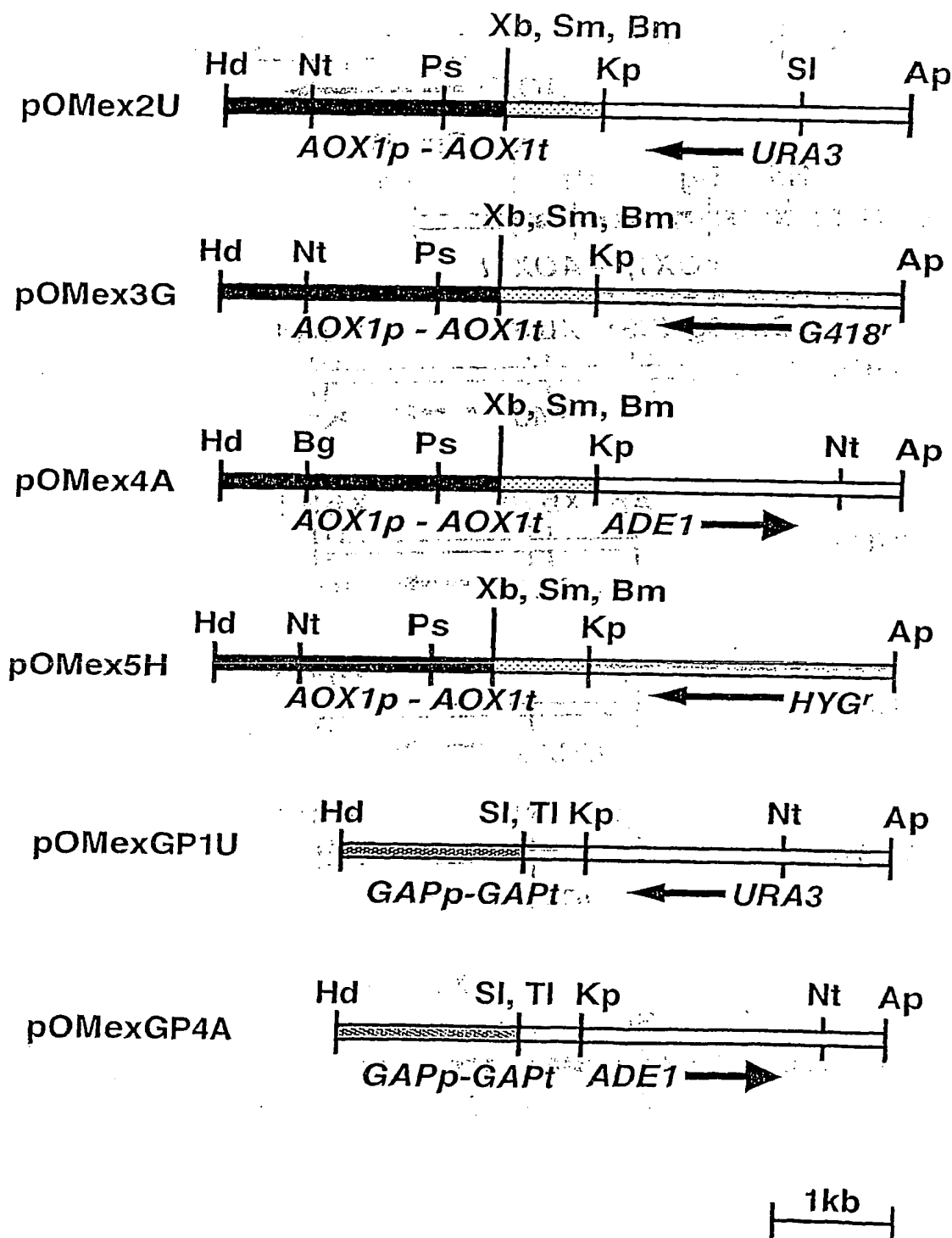
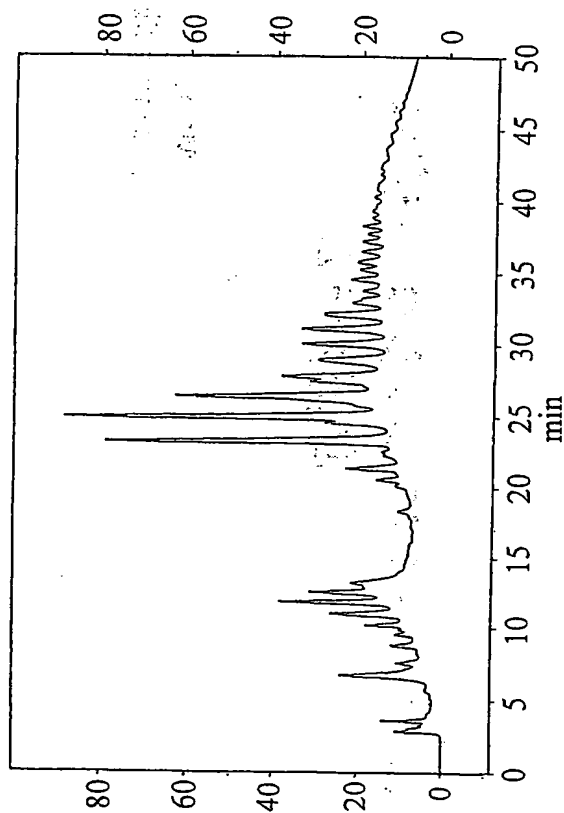
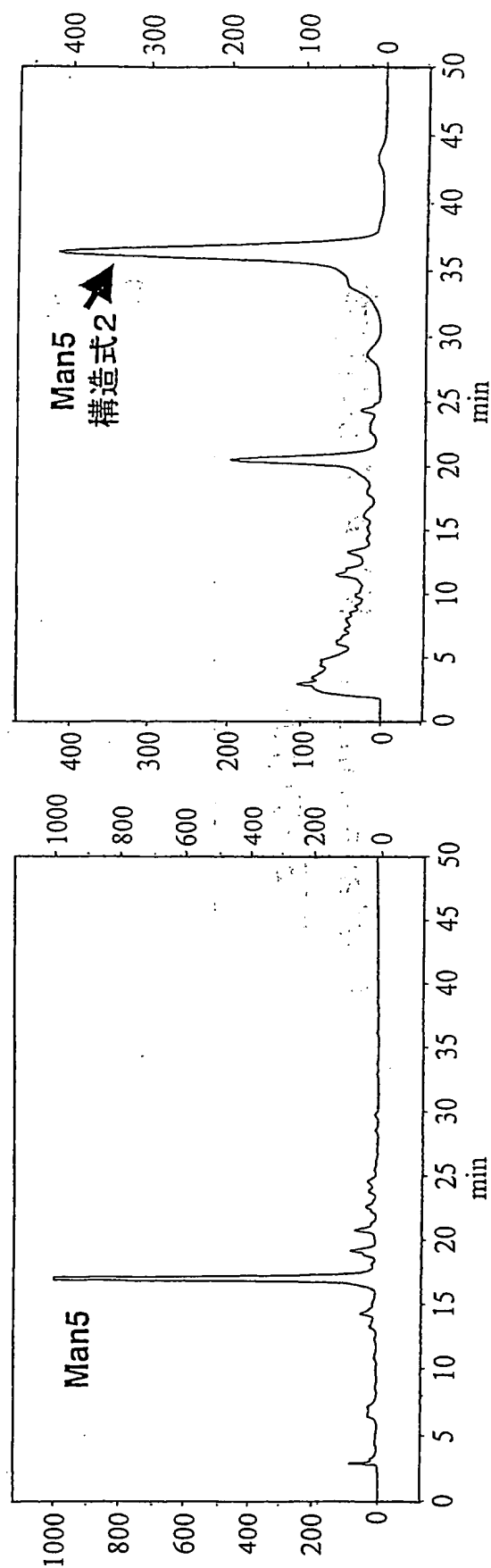


図 19

Ogataea minuta TK3-A(Δ och1)株
アミドカラム

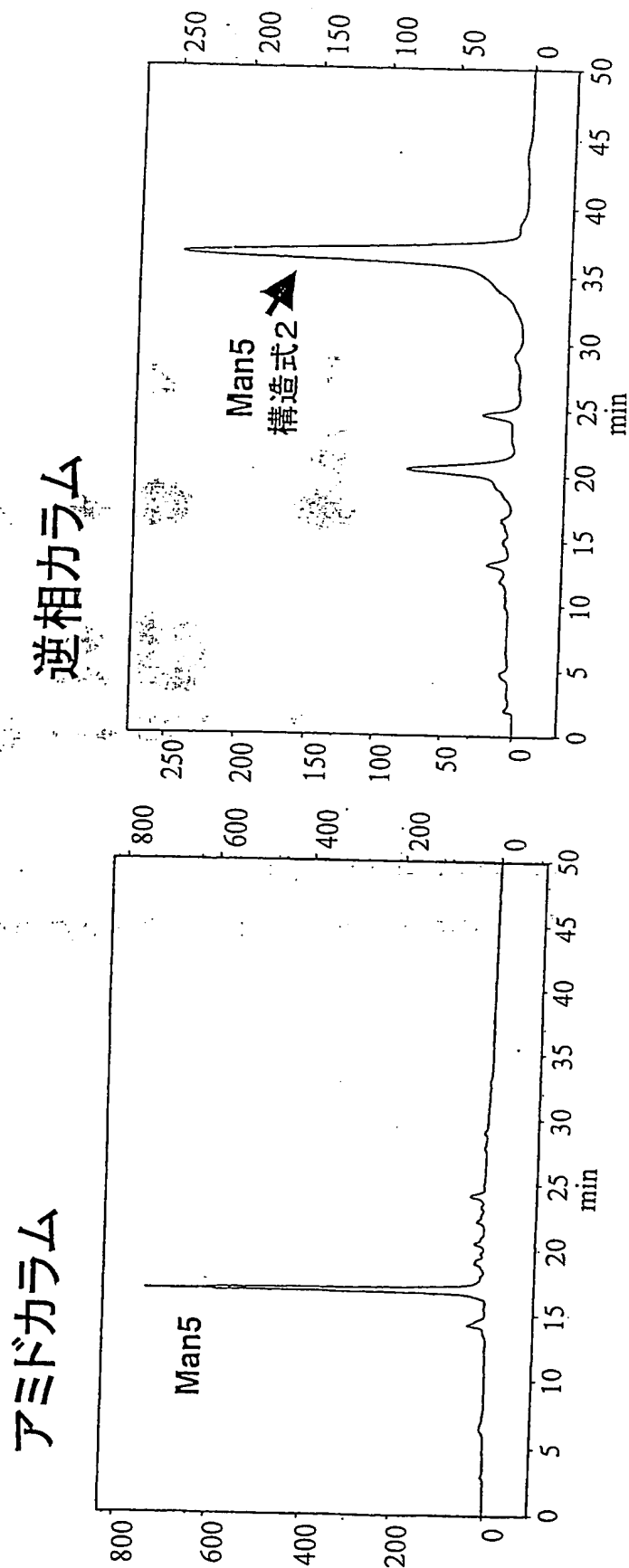


Ogataea minuta TK3-A(Δ och1+ α -1,2マンノシダーゼ)株
アミドカラム 逆相カラム



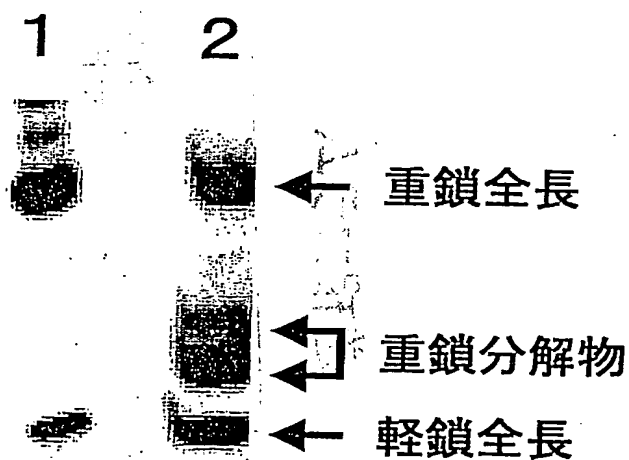
14/1/26

図 20



14/2/26

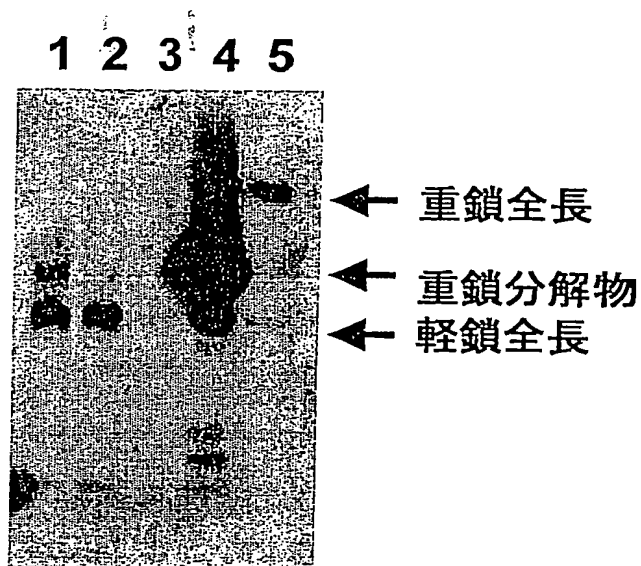
図 2 1



1: コントロール抗体

2: Ogataea minuta TK9-IgB-aM株の生産する抗体

図 2 2



1. 培養上清
2. カラム非吸着画分
3. 洗浄液画分
4. 溶出画分
5. コントロール抗体

図 2 3

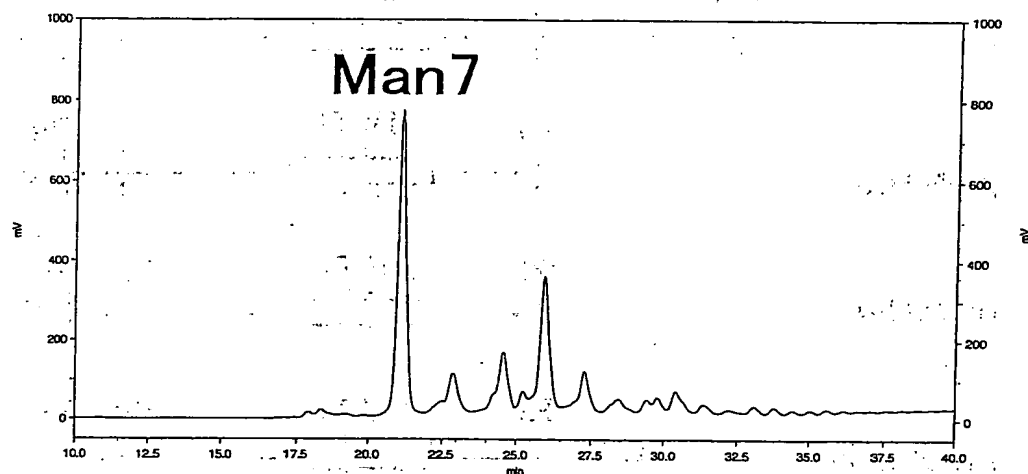
1 2



1. コントロール抗体
2. *Ogataea minuta* TK9-IgB-aM株の生産する抗体

図 2 4

A



B

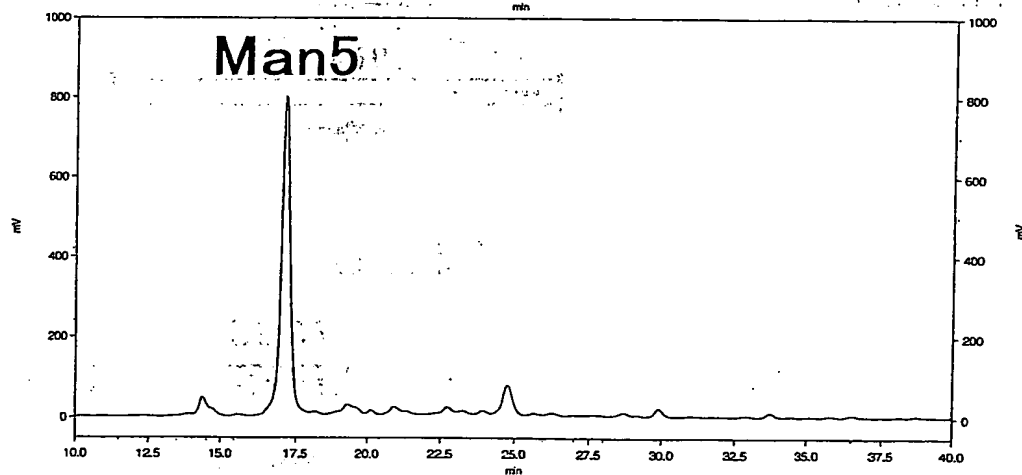
A. *Ogataea minuta* TK9-IgB株B. *Ogataea minuta* TK9-IgB-aM株

図 2 5

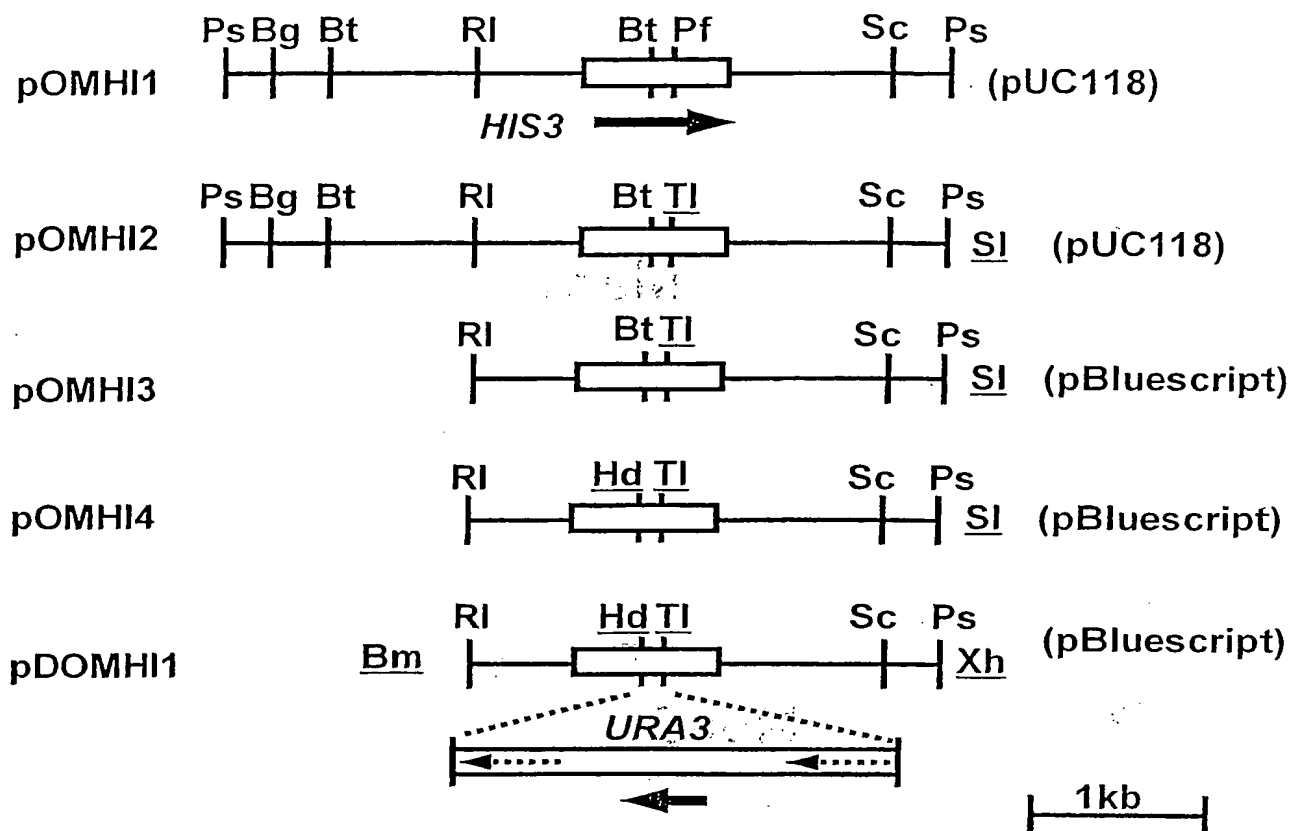


図 2 6

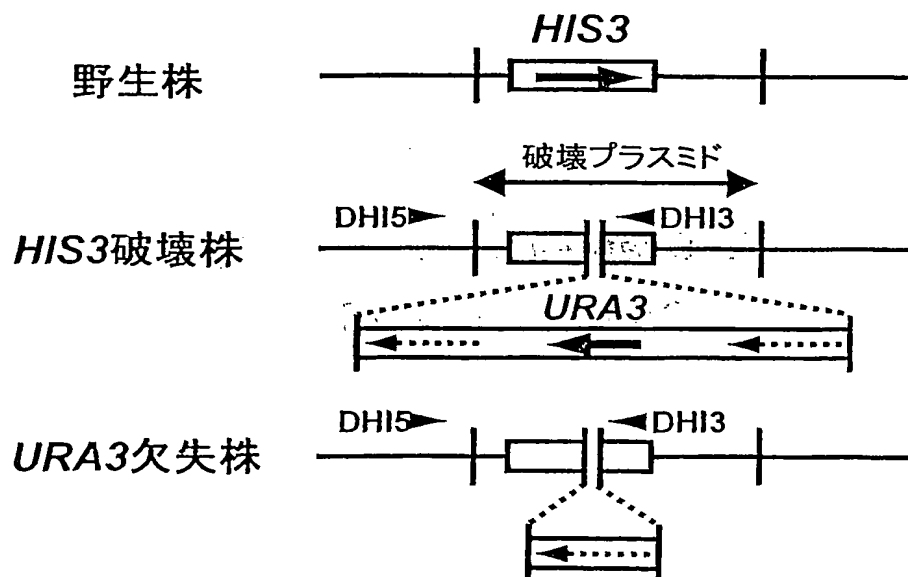


図 2 7

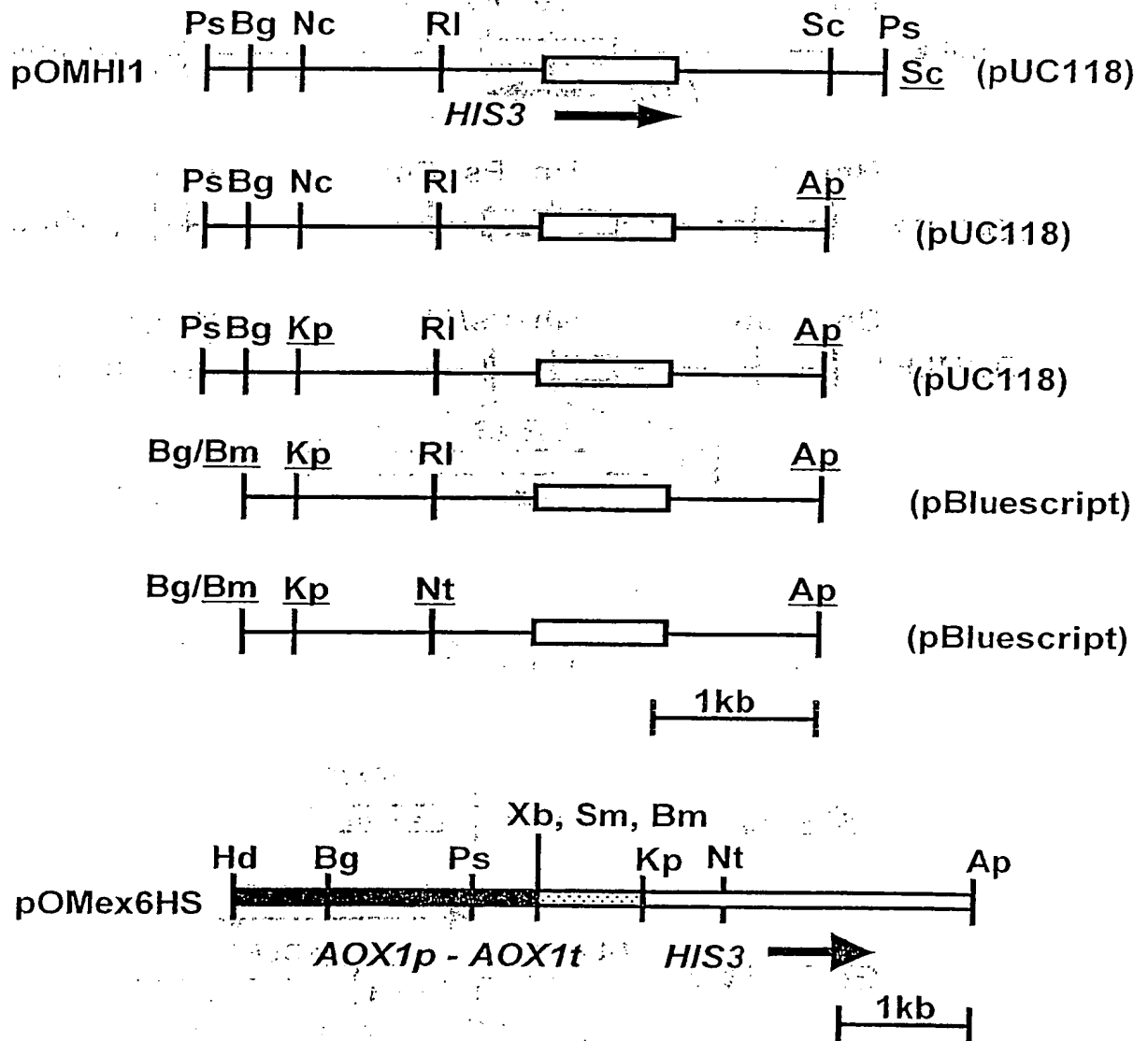


図 2 8

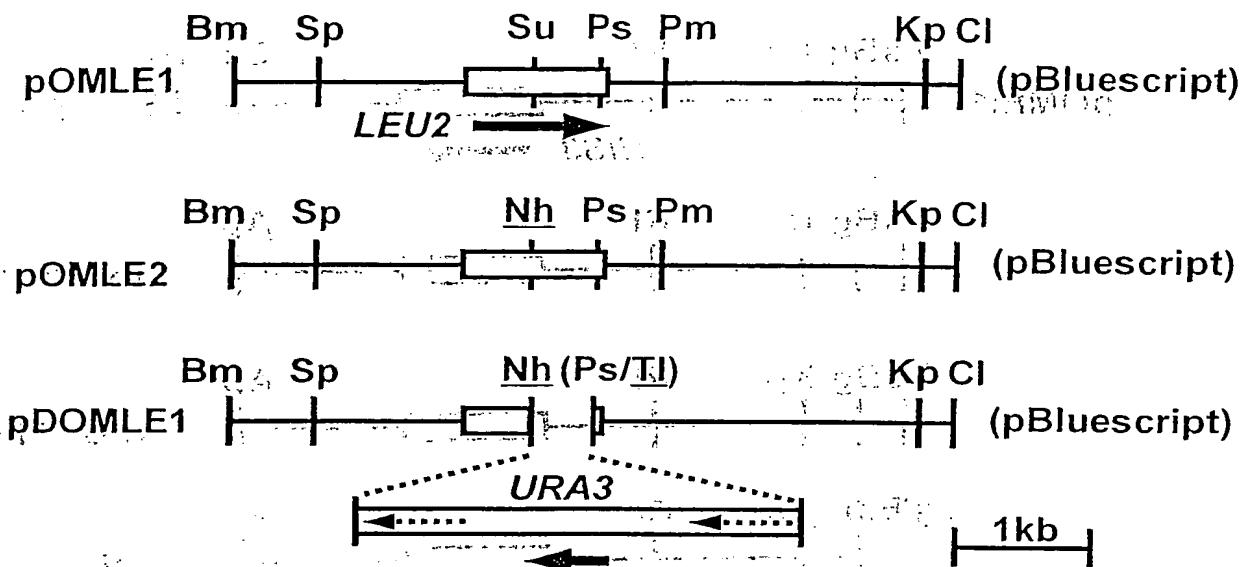


図 2 9

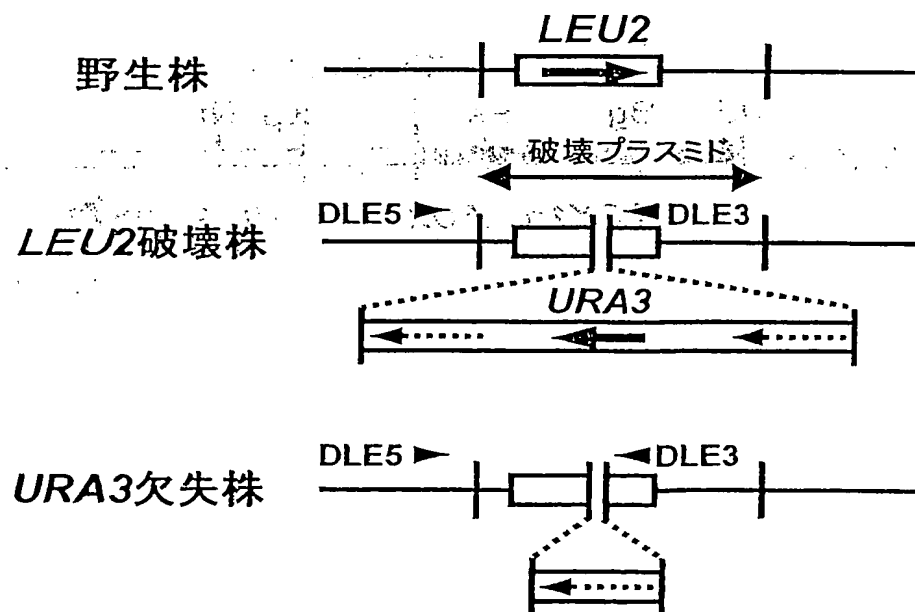


図 30

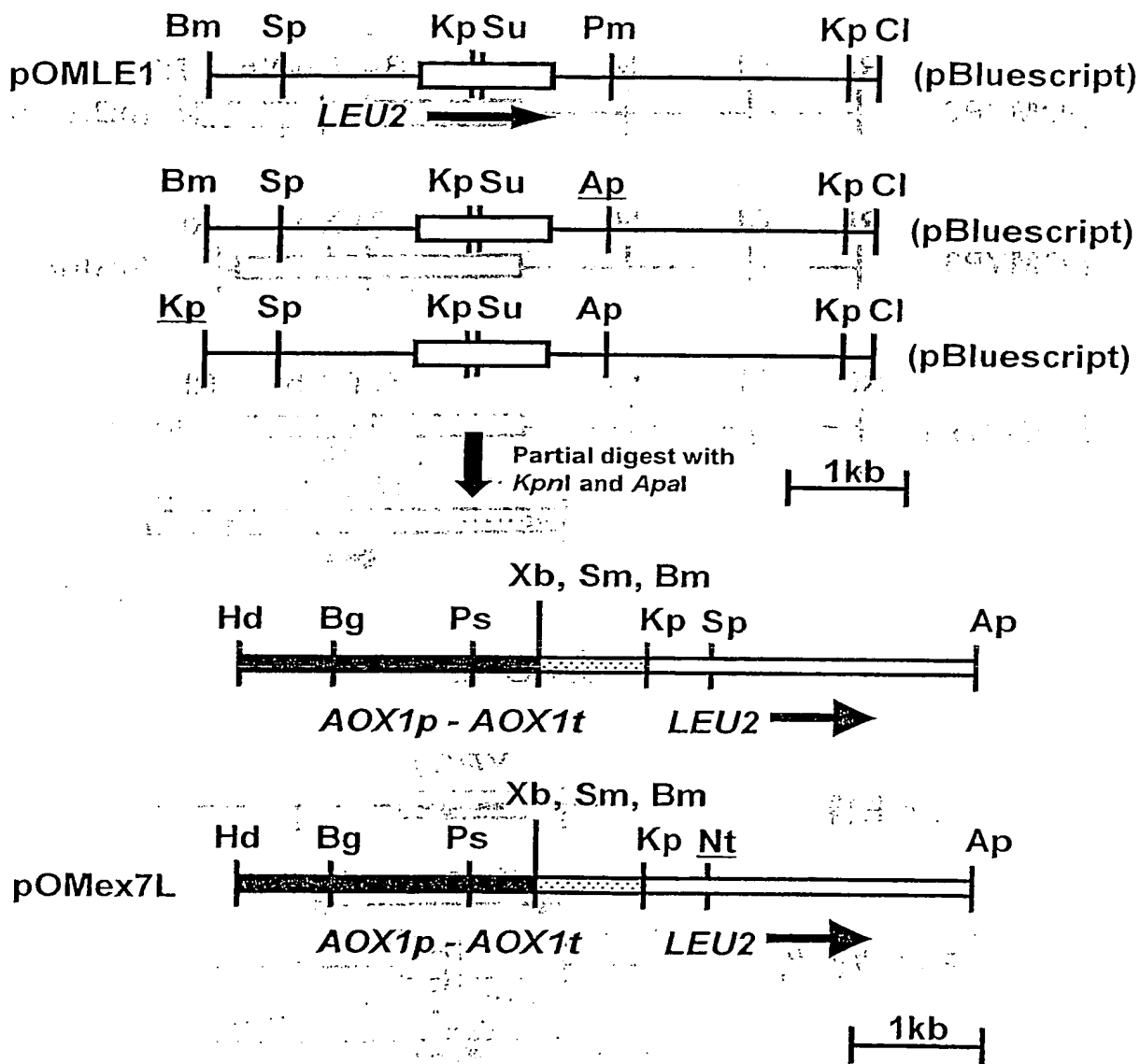


図 3 1

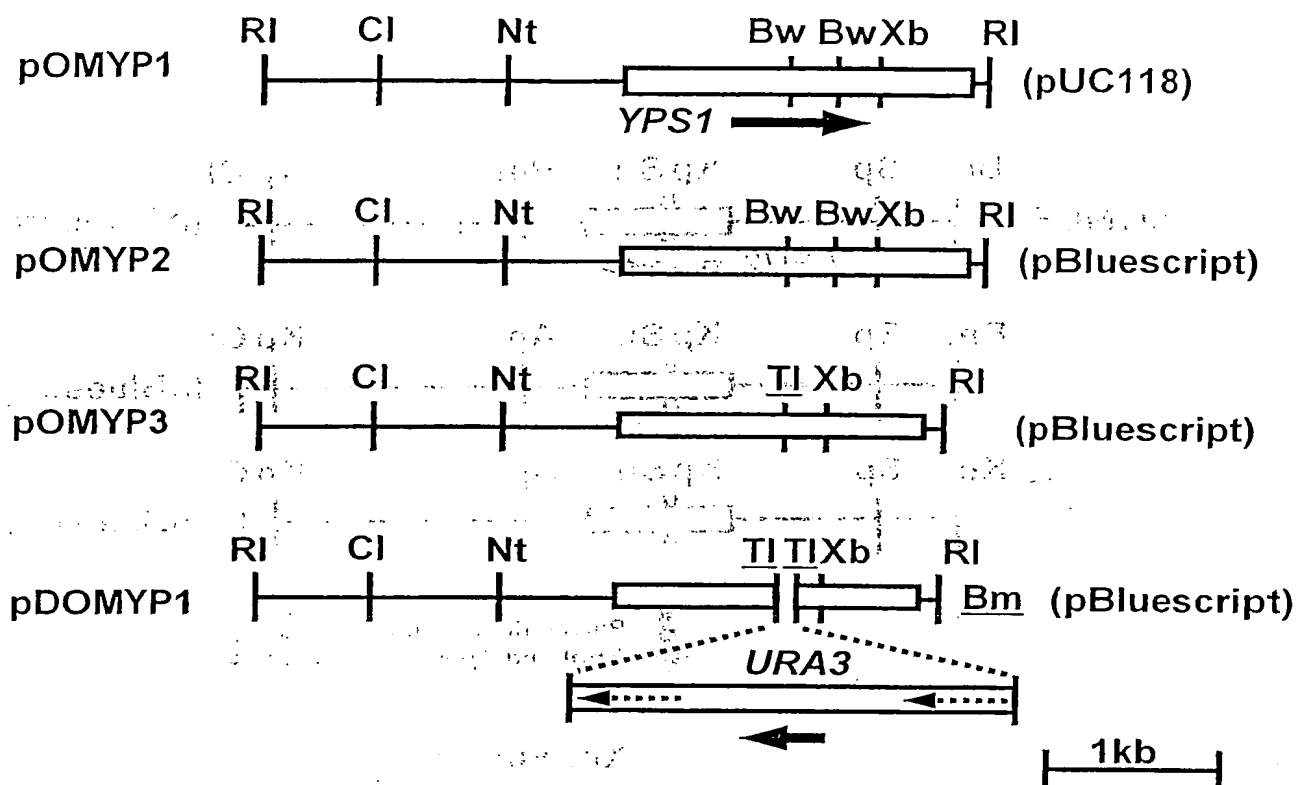


図 3 2

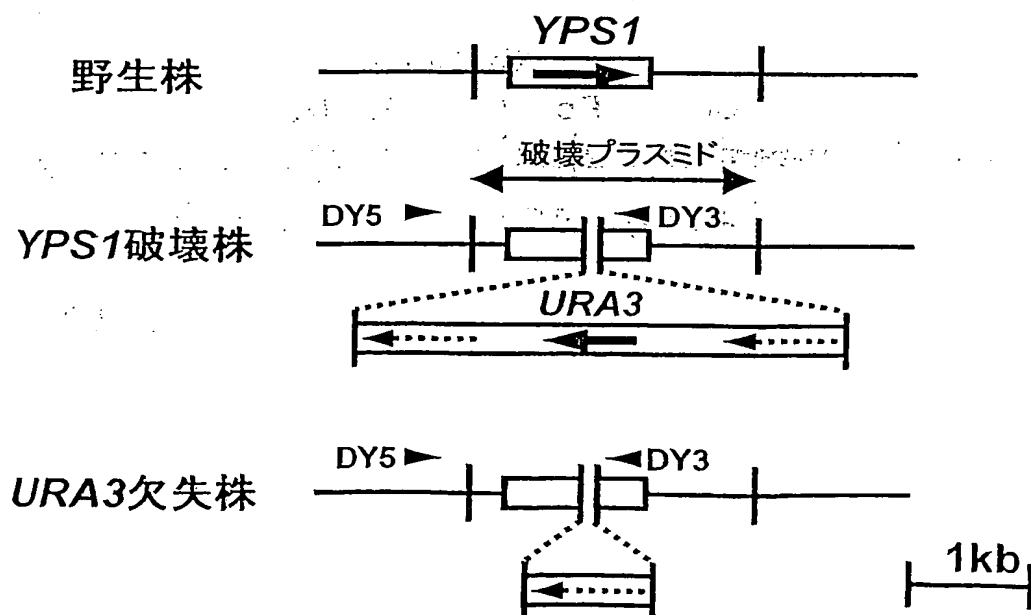


図 3 3

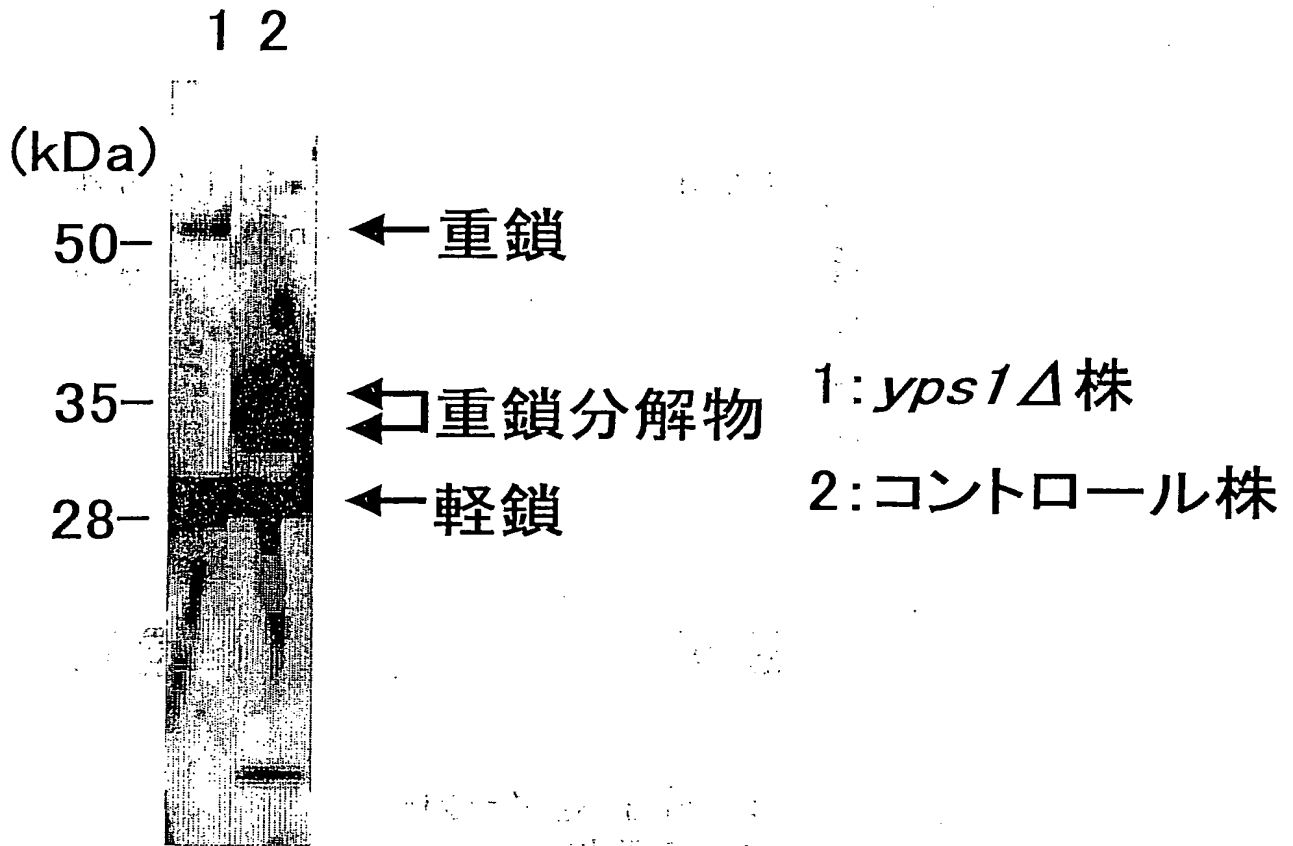
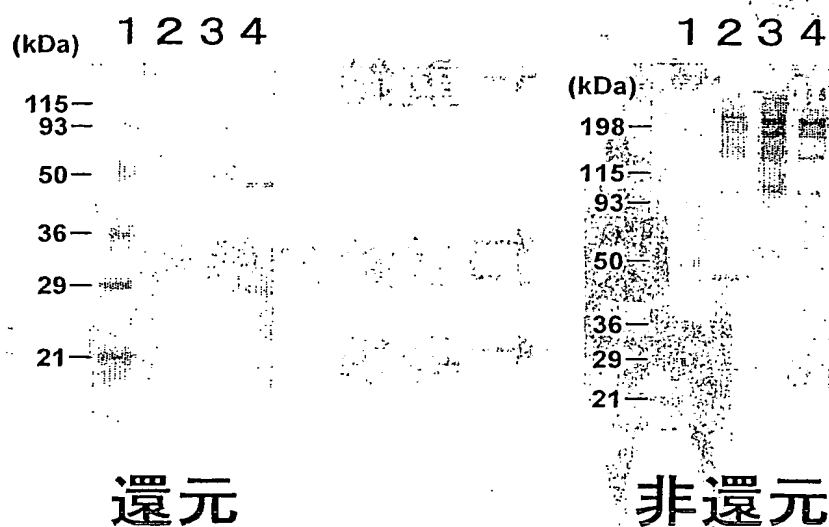


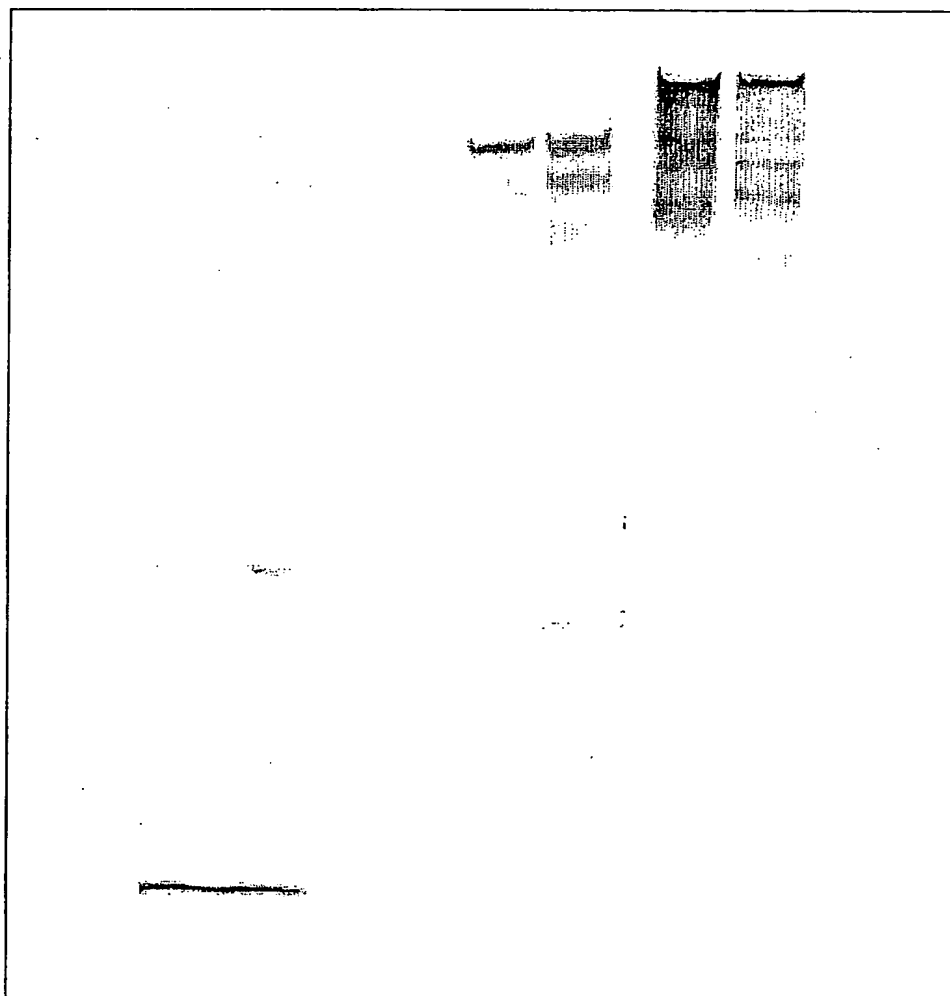
図 3 4



- 1 分子量マーカー
2 酵母培養上清
3 ProteinA溶出画分
4 コントロール抗体

図 3 5

1 2 3 4 5 6



レーン1,3,5 ;

コントロール株 (Ogataea minuta YK3-IgB1-aM株)

レーン2,4,6 ;

PDI導入株 (Ogataea minuta YK3-IgB1-aM-P株)

レーン1,2 ; 還元 (培養上清)

レーン3,4 ; 非還元 (培養上清)

レーン5,6 ; 非還元 (菌体抽出物)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.